

UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOSYNTHESE
DES PHYCOCYANIN-CHROMOPHORS
PHYCOCYANOBILIN

Strukturaufklärungen und
Synthese einer Modellverbindung

Eva Maria Benedikt

**UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOSYNTHESE
DES PHYCOCYANIN-CHROMOPHORS
PHYCOCYANOBILIN
Strukturaufklärungen und
Synthese einer Modellverbindung**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Eva Maria Benedikt
aus Augsburg

Oktober 1986

1. Berichterstatter: PD Dr. H.-P. Köst

2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rüdiger

Tag der mündlichen Prüfung: 28. 1. 1987

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn P. D. Dr. H.-P. Köst am Botanischen Institut der Universität München angefertigt.

Herrn Dr. H.-P. Köst danke ich herzlich für seine Unterstützung durch wertvolle Ratschläge, großes Interesse und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. A. Gossauer, Institut für organische Chemie (Fribourg), gilt mein besonderer Dank für die Möglichkeit, an seinem Institut und unter seiner Anleitung die Gallenfarbstoff-Synthese durchführen zu können, sowie für großzügige Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. W. Rüdiger danke ich für sein Interesse an meiner Arbeit und anregende Diskussionen.

Für Messungen in Fribourg danke ich herzlich Frau E. Trieschmann (360 MHz-NMR-Spektren und Massenspektren), Herrn Dr. G. Holze (Massenspektren), Herrn Dr. T. Jenny (360 MHz-NMR-Spektren) und Herrn F. Nydegger (Elementaranalysen).

Herrn Dr. R. Neier (Fribourg) möchte ich herzlich danken für wertvolle Hilfe und viele interessante Diskussionen.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern in München und Fribourg, die mir geholfen haben, besonders Herrn Dipl. Chem. P. Nesvadba für wertvolle "Starthilfe" in der Chemie.

Für die Beschaffung gefriergetrockneter Ovarien von Turbo cornutus danke ich Herrn Prof. Dr. K. Yamaguchi und Herrn Dr. W. Miki (Japan).

Herrn Prof. A. Jörg, Institut für physiologische Chemie (Fribourg), danke ich für die Benutzung des DC-Scanners, Herrn Dipl. Chem. R. Asmis für die Einweisung in das Gerät.

Für finanzielle Unterstützung danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) sowie dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

1. Hans-Peter Köst and Eva Benedikt,
Biliverdin IX α , Intermediate and End Product of Tetrapyrrole Bio-
synthesis
Z. Naturforsch. 37c, 1057 (1982)
2. Eva Benedikt and Hans-Peter Köst,
A- α -hydroxymesobiliverdin, a New Bile Pigment
Z. Naturforsch. 40c, 755 (1985)
3. Eva Benedikt and Hans-Peter Köst,
Synthesis of 5-aminolevulinic acid
Z. Naturforsch. 41b, 138 (1986)

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Zusammenfassung der Ergebnisse	1
2 Einleitung	3
2.1 Allgemeine Übersicht über das Vorkommen von Gallenfarbstoffen	3
2.2 Phycobiliproteide: Phycocyanin, Phycoerythrin, Allophycocyanin	5
2.2.1 Struktur der Chromophore	5
2.2.2 Struktur der Chromoproteide	8
2.2.3 Funktion der Phycobiliproteide und Organisation der Phycobilisomen	10
2.2.4 Biosynthese	11
2.3 Problemstellung	15
3 Resultate und Diskussion	16
3.1 3 stufige Synthese von 5-Aminolävulinsäure-hydrochlorid (5-ALA)(5)	16
3.2 Darstellung von Vergleichsgallenfarbstoffen sowie Zuordnung der 360 MHz- ¹ H-NMR-Spektren durch NOE-Experimente	17
3.2.1 E-Phycocyanobilin-dimethylester (E-PCBdme)(6) und trans-Methanol-Addukte 7 und 8	17
3.2.2 Biliverdin-dimethylester (BVdme) IXα (9), IXβ (10), IXγ (11) und IXδ (12)	20
3.3 Nachweis von Biliverdin IXα (BV IXα)(9) sowie Struktur- aufklärung eines 3 ¹ -Hydroxy-Mesobiliverdins IXα (OH-MBV) (21) aus dem Medium von <u>Cyanidium caldarium III-D-2</u> nach Inkubation mit 5-Aminolävulinsäure-hydrochlorid (5-ALA)(5)	26
3.3.1 <u>Cyanidium caldarium</u> : Taxonomie, Anzucht, Inkubation, Aufschluß und Extraktion der Pigmente	26
3.3.2 Vergleich der Pigmente aus den Zellen mit jenen aus dem Medium nach Inkubation mit 5-ALA (5)	27
3.3.3 Identifizierung von Biliverdin-dimethylester IXα (BVdme IXα)(9)	27
3.3.3.1 DC-Vergleich	27
3.3.3.2 Chromsäureabbau	28
3.3.3.3 UV/VIS-Spektroskopie	28

	Seite
3.3.3.4 Massenspektroskopie	29
3.3.3.5 ^1H -NMR-Spektrum	30
3.3.3.6 Diskussion	30
3.3.3.7 Diskussion neuerer Literatur	32
3.3.3.8 Schlußfolgerungen	33
3.3.4 Strukturaufklärung des blauen, polaren Farbstoffs <u>21</u>	35
3.3.4.1 Vorbemerkungen	35
3.3.4.2 UV/VIS-Spektroskopie	35
3.3.4.3 Chromsäureabbau	37
3.3.4.4 FAB-Massenspektroskopie	37
3.3.4.5 ^1H -NMR-Spektroskopie	38
3.3.4.6 Diskussion	41
3.3.5 Inkubation von E-Phycocyanobilin (E-PCB) und 3^1 -Hydroxy-Mesobiliverdin IX α (OH-MBV) mit <u>Cyanidium caldarium III-D-2</u> sowie mit Kulturmedium	42
3.3.5.1 Inkubation von E-PCB und 5-ALA	42
3.3.5.2 Inkubation von OH-MBV	44
3.3.5.3 Aufschluß der Algen	46
3.3.5.4 Diskussion	46
3.4 Gallenfarbstoffe aus der Meeresschnecke <u>Turbo cornutus</u>	48
3.4.1 Turboverdin (<u>22</u>)	48
3.4.2 Strukturaufklärung von Farbstoff <u>23</u>	51
3.4.2.1 Verhalten bei der DC	51
3.4.2.2 UV/VIS-Spektroskopie	51
3.4.2.3 Chromsäureabbau	52
3.4.2.4 ^1H -NMR-Spektrum	53
3.4.2.5 NOE-Experimente	55
3.4.2.6 Isomerisierung von BVdme IX δ (<u>12</u>) zu NBVdme IX δ (<u>23</u>)	57
3.4.3 Identifizierung von BV IX δ (<u>12</u>)	57
3.4.4 Diskussion	57
3.5 Chemische Totalsynthese von (Z,Z,Z)-(2RS,3SR)-8,12-bis-[2-(Methoxycarbonyl)-ethyl]-3-ethenyl-18-ethyl-1,2,3,19,22,24-hexahydro-2,7,13,17-tetramethyl-21H-bilin-1,19-dion (rac. <u>61</u>)	61
3.5.1 Vorbemerkungen	61
3.5.2 Synthese-Konzept	63

	Seite
3.5.3 Darstellung von Pyrrolinon <u>34</u>	66
3.5.4 Darstellung von Dipyrrinon rac. <u>49</u>	66
3.5.4.1 Kondensation und Veresterung	66
3.5.4.2 Hydrierung und Isomerisierungsversuche	67
3.5.4.3 Umsetzung zum Selenid und Isomerisierung	73
3.5.4.4 Oxidation zur Vinylgruppe	75
3.5.5 Formylierung und Kondensation zum Selenid-Gallenfarbstoff rac. <u>59</u>	77
3.5.6 Oxidation zur Vinyl-Gruppe	81
3.5.7 Diskussion der Umlagerung der Vinyl-Gruppe in eine Ethyliden-Gruppe	86
3.5.8 Diskussion	90
4 Experimenteller Teil	91
4.1 Allgemeines	91
4.2 3 stufige Synthese von 5-Aminolävulinsäure-hydrochlorid (5-ALA)(<u>5</u>)	94
4.2.1 5-Bromlävulinsäure-methylester (<u>2</u>)	94
4.2.2 5-Phthalimidolävulinsäure-methylester (<u>4</u>)	95
4.2.3 5-Aminolävulinsäure-hydrochlorid (5-ALA)(<u>5</u>)	96
4.3 Darstellung von Vergleichsgallenfarbstoffen	98
4.3.1 E-Phycocyanobilin-dimethylester (E-PCBdme)(<u>6</u>) und trans-Methanol-Addukte <u>7</u> und <u>8</u>	98
4.3.2 Biliverdin-dimethylester (BVdme) IX α (<u>9</u>), IX β (<u>10</u>), IX γ (<u>11</u>) und IX δ (<u>12</u>)	102
4.4 Nachweis von Biliverdin IX α (BVdme IX α)(<u>9</u>) sowie Strukturaufklärung eines 3 ¹ -Hydroxy-Mesobiliverdins <u>21</u> aus dem Medium von <u>Cyanidium caldarium III-D-2</u> nach Inkubation mit 5-Aminolävulinsäure-hydrochlorid (5-ALA)(<u>5</u>)	109
4.4.1 <u>Cyanidium caldarium III-D-2</u> : Anzucht und Inkubation	109
4.4.1.1 Medien für die heterotrophe Anzucht sowie für die Inkubation	109
4.4.1.2 Anzucht und Inkubationsbedingungen	109
4.4.2 Isolierung der Pigmente	111
4.4.2.1 aus dem Medium	111
4.4.2.2 den Zellen	111
4.4.3 Chromsäureabbau von ¹⁴ C-markierten Pigmenten	112

	Seite
4.4.4 3 ¹ -Hydroxy-Mesobiliverdin-dimethylester IXa (21)	112
4.5 Gallenfarbstoffe aus den Ovarien von <u>Turbo cornutus</u>	114
4.5.1 Isolierung der Gallenfarbstoffe <u>12</u> , <u>22</u> , <u>23</u>	114
4.5.2 Darstellung von Turboverdin (22)	118
4.5.3 Darstellung von Neobiliverdin-dimethylester IXδ (NBVdme IXδ)(23)	119
4.6 Synthese von Gallenfarbstoff rac. <u>61</u>	120
4.6.1 Verbindung <u>30</u>	120
4.6.2 Verbindung <u>32</u>	121
4.6.3 Verbindung <u>33</u>	123
4.6.4 Verbindung <u>34</u>	124
4.6.5 Verbindung <u>35</u>	125
4.6.6 Verbindung <u>36</u>	127
4.6.7 Verbindung <u>37</u>	128
4.6.8 Verbindungen rac. <u>38</u> und <u>39</u>	130
4.6.9 Verbindung rac. <u>40</u>	135
4.6.10 Verbindung rac. <u>41</u>	137
4.6.11 Verbindung rac. <u>46</u>	139
4.6.12 Verbindungen rac. <u>47</u> und <u>48</u>	143
4.6.13 Verbindung rac. <u>49</u>	148
4.6.14 Verbindung <u>50</u>	151
4.6.15 Verbindungen <u>51</u> und <u>52</u>	152
4.6.16 Verbindung rac. <u>53</u>	155
4.6.17 Verbindung rac. <u>54</u>	156
4.6.18 Verbindung <u>57</u>	158
4.6.19 Verbindung rac. <u>59</u>	159
4.6.20 Verbindung <u>60</u>	161
4.6.21 Verbindungen rac. <u>61</u> und rac. <u>20</u>	164
4.6.22 Verbindung rac. <u>62</u>	167
5 Literaturverzeichnis	170

Abkürzungen

ADC	analytische Dünnschichtchromatographie
5-ALA	5-Aminolävulinsäure(-hydrochlorid)
BVdme	Biliverdin-dimethylester
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EI-MS	Elektronenionisations-Massenspektrum
FAB-MS	fast atom bombardement-Massenspektrum
FM	Fließmittel
HV	Hochvakuum
LM	Lösungsmittel
MG	Molekulargewicht
NOE	nuclear Overhauser enhancement
NBVdme	Neobiliverdin-dimethylester
OH-MBV	3 ¹ -Hydroxy-Mesobiliverdin IX α
PC	Phycocyanin
PCBdme	Phycocyanobilin-dimethylester
PE	Phycoerythrin
PEB	Phycoerythrobilin
PUB	Phycourobilin
PDC	präparative Dünnschichtchromatographie
PSC	präparative Schichtchromatographie
RV	Rotationsverdampfer
SC	Säulenchromatographie
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran

1 Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Ausgehend von Lävulinsäure wurde eine 3 stufige Synthese für 5-ALA (5) entwickelt.
2. Von den zu Vergleichszwecken hergestellten Gallenfarbstoffen E-PCBdme (6), den beiden diastomeren trans-Methanol-Addukten von E-PCBdme 7+8 sowie den 4 BVdme-Isomeren IX α (9), IX β (10), IX γ (11) und IX δ (12) wurden 360 MHz-¹H-NMR-Spektren aufgenommen und mit Hilfe von NOE-Experimenten eine Zuordnung aller Signale getroffen.
3. Nach Inkubation der einzelligen Alge Cyanidium caldarium III-D-2 mit 5-ALA (5) wurden die ins Medium ausgeschiedenen Pigmente mit jenen in der Zelle dünnschichtchromatographisch verglichen. Ein Unterschied wurde nicht festgestellt.
4. Aus dem Medium von Cyandium caldarium III-D-2 ließ sich nach Inkubation mit 5-ALA (5) BVdme IX α (9) isolieren, was ein Hinweis für eine Algen-Hämoxxygenase ist.
5. Die Struktur eines weiteren aus dem Medium von Cyanidium caldarium III-D-2 isolierten Farbstoffs wurde aufgeklärt. Es handelt sich um ein 3¹-Hydroxy-Mesobiliverdin IX α (OH-MBV) (21).
6. Es konnte gezeigt werden, daß Farbstoff 21 auch bei der Inkubation von E-PCB mit Wasser oder Medium gebildet wird.
7. Zur Klärung der Herkunft des Hydroxy-Farbstoffs 21 im Medium von Cyanidium caldarium III-D-2 wurden Inkubationen mit E-PCB bzw. 5-ALA durchgeführt und das Verhältnis E-PCB/OH-MBV bestimmt. Im Ansatz Algen + 5-ALA war zu Beginn der Farbstoffausscheidung mehr OH-MBV als E-PCB vorhanden, erst nach 3 Tagen kehrte sich das Verhältnis um. Möglicherweise wird Chromophor 21 durch Umlagerung eines noch unbekannten Zwischenprodukts der Biosynthese des PCB gebildet.
8. Es konnte gezeigt werden, daß bei Inkubation sowohl E-PCB als auch OH-MBV von Cyanidium caldarium III-D-2 aufgenommen wird.
9. Der 3¹-Hydroxy-Gallenfarbstoff 21 aus Cyanidium caldarium wurde

mit dem in der Literatur beschriebenen 3²-Hydroxy-Gallenfarbstoff 22 aus Ovarien der Meeresschnecke Turbo cornutus verglichen. Die Zugehörigkeit von Farbstoff 22 zur IX α -Reihe wurde durch NOE-Experimente bewiesen. Chromophor 22 wurde außerdem durch eine chemische Totalsynthese dargestellt.

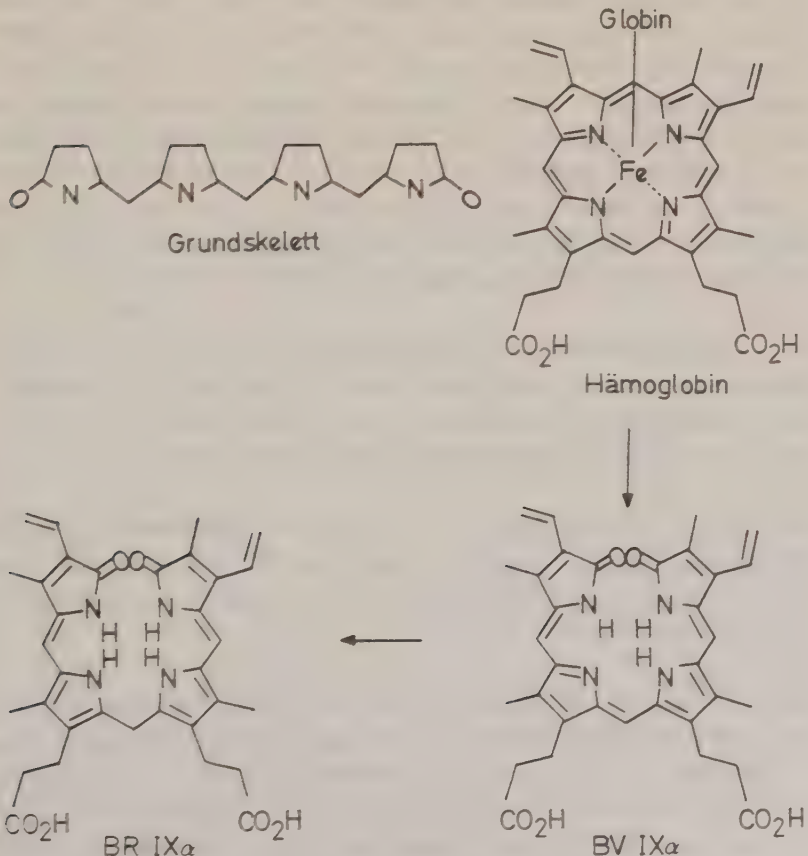
10. Aus den Ovarien von Turbo cornutus wurden zwei weitere Gallenfarbstoffe isoliert. Die Strukturaufklärung von Chromophor 23 wurde mittels NMR-Spektroskopie durchgeführt. Farbstoff 23 ist ein Neobiliverdin (NBV) mit der ungewöhnlichen IX δ -Struktur. Der zweite Chromophor wurde als BV IX δ (12) identifiziert.
11. Ein mögliches Biosynthese-Zwischenprodukt (rac. 61) des Phycocyanin-Chromophors wurde durch eine chemische Totalsynthese dargestellt. Chromophor rac. 61 unterscheidet sich von Phycocyanobilin nur durch die Vinyl-Gruppe anstelle der Ethyliden-Gruppe an C(3) des A-Rings. Es zeigte sich, daß die Vinyl-Gruppe von rac. 61 in eine Z-konfigurierte Ethyliden-Gruppe umlagert, aus rac. 61 also Z-PCBdme (rac. 20) gebildet wird.

2 Einleitung

2.1 Allgemeine Übersicht über das Vorkommen von Gallenfarbstoffen

Als Gallenfarbstoffe bezeichnet man heute Derivate des [21H]-Bilin-1,19-dions (Abb. 1) [1]. Der Name geht zurück auf Bilirubin IX α (BR IX α) (Abb. 1), das aus Gallensteinen isoliert worden war, und dessen Strukturaufklärung als erste in dieser Verbindungsklasse gelang [2]. Vorläufer ist Biliverdin IX α (BV IX α), das beim enzymatischen Abbau des Hämoglobins entsteht (Abb. 1). Während das im Hämoglobin enthal-

Abb. 1: Schema der Biosynthese von BR IX α und BV IX α in Tieren



tene Eisen im Organismus verbleibt, wird BV IX α über BR IX α zu Stercobilinogen und Urobilinogen abgebaut, die ausgeschieden werden [3,4]. Die Gallenfarbstoffe selbst haben also in diesem Fall keine physiologische Funktion.

Manche Tiere verwenden Gallenfarbstoffe als farbgebende Substanz und lagern diese in Gewebe ein. Ein Beispiel ist der Mittelmeerfisch Crenilabrus pavo C. V., in dessen Flossen ein blaues Chromoproteid mit BV IX α als Chromophor enthalten ist [5,6]. Auch bei Nicht-Vertebraten, die keine größeren Mengen an Häm oder Porphyrinen besitzen, findet man Gallenfarbstoffe, zum Teil als Proteide. Beispiele sind die Insekten Mantis religiosa (Gottesanbeterin) [7] und Chrysopa carnea (Florfliege) [8], deren grüne Farbe ebenfalls von BV IX α stammt, sowie die Meeresschnecken Aplysia limacina, die im Abwehrsekret Aplysiovioletin enthält [9,10], und Turbo cornutus, aus deren Ovarien Turboverdin isoliert worden ist [11,12]. Mit einer einzigen Ausnahme handelt es sich bei allen bisher in der Literatur beschriebenen natürlichen Gallenfarbstoffen um IX α -Isomere, d. h. der Porphyrinring ist an der α -Position geöffnet worden. Schmetterlinge dagegen besitzen ausschließlich IX γ -Derivate [13-15]. Bei Laccophilus minutus, einem Käfer, ist ebenfalls BV IX γ gefunden worden [16].

Im Pflanzenreich kommen ebenfalls Gallenfarbstoffe vor. Die drei häufigsten und am besten untersuchten sind die Chromophore Phytochromobilin, Phycocyanobilin und Phycoerythrobilin der Biliproteine Phytochrom, Phycocyanin, Phycoerythrin und Allophycocyanin.

Phytochrom, ein photoreversibles Proteid mit Phytochromobilin als Chromophor, findet man zum Teil bei niederen, vor allem aber bei höheren Pflanzen, wo es regulatorisch auf Wachstums- und Entwicklungsprozesse wirkt [17,18].

Als Phycocyan (heute Phycocyanin, PC) und Phycoerythrin (PE) bezeichnete 1843 erstmals Kützing [19] die wasserlöslichen Farbstoffe aus Cyanophyceen (blau, PC) und Rhodophyceen (rot, PE), wobei letztere auch PC enthalten. Engelmann brachte sie in Zusammenhang mit der Photosynthese [20], Molisch zeigte, daß es sich um Proteine handelt

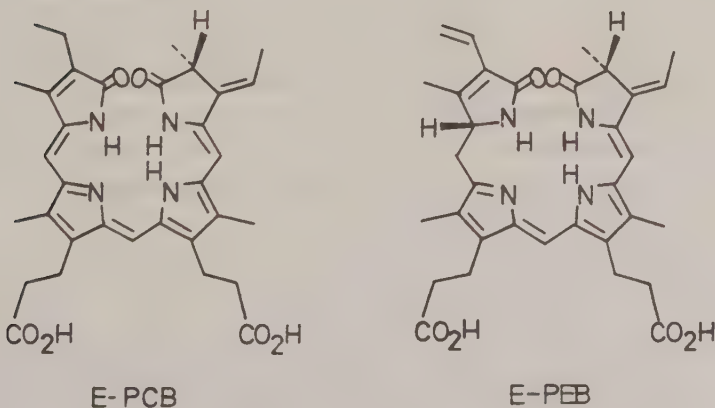
[21,22] und Lemberg ordnete die Chromophore als erster bei den Gallenfarbstoffen ein [23] und nannte die abgespaltenen Chromophore Phycocyanobilin (PCB) bzw. Phycoerythrobilin (PEB) [24].

2.2 Phycobiliproteide: Phycocyanin, Phycoerythrin, Allophycocyanin

2.2.1 Struktur der Chromophore

Die Strukturaufklärung der bereits von Lemberg als Gallenfarbstoffe erkannten Chromophore PCB und PEB erfolgte nach Abspaltung vom Protein. Es wurde mit verschiedenen Methoden abgespalten: durch Kochen in Methanol [25], mit Salzsäure [26], mit Bromwasserstoff/Eisessig [27] und mit dem Enzym Nagarse [28]. Neben anderen Pigmenten, deren Strukturen auch heute noch nicht alle bekannt sind, findet man bei allen Verfahren PCB und PEB (Abb. 2), deren Strukturen unabhängig in drei Arbeitsgruppen durch Chromsäureabbau [29,30] sowie durch Massenspektroskopie und NMR-Spektroskopie [31-34] aufgeklärt worden sind. Durch Totalsynthesen [35-38] wurden beide Strukturen bestätigt.

Abb. 2: Struktur der vom Protein abgespaltenen Chromophore PCB und PEB (E bezeichnet die Konfiguration an der Ethyliden-Doppelbindung.)



Gegenüber den am Protein gebundenen Chromophoren, für die meist ebenfalls die Bezeichnungen PCB und PEB verwendet werden, besitzen die abgespaltenen Gallenfarbstoffe an Ring A eine Ethyliden-Seitenkette und liegen in einer helicalen Konformation vor, während die gebundenen Chromophore eine gestreckte Konformation besitzen (Abb. 3).

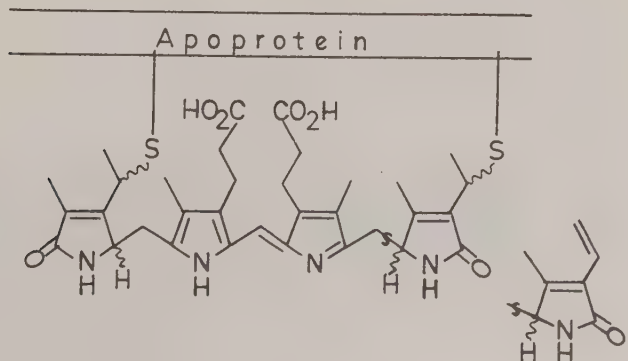
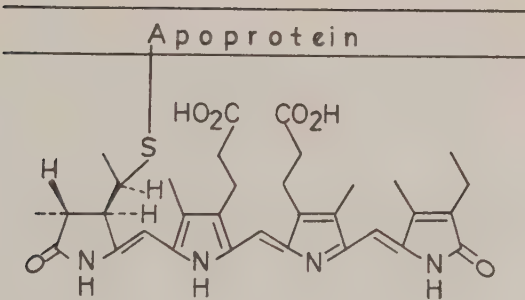
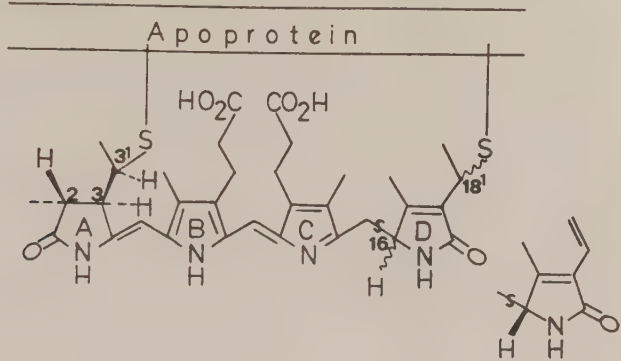
Neben den beiden häufigsten Phycobilinen PCB und PEB werden in der Literatur noch Chromophore mit unbekannter Struktur beschrieben [39-41] sowie ein Phycourobilin (PUB) (Abb. 3a). Dessen Strukturaufklärung erfolgte durch ^1H -NMR-Spektroskopie, jedoch nicht am abgespaltenen Chromophor sondern am Chromopeptid [42], da es mit den üblichen Methoden nicht möglich ist, den Gallenfarbstoff ohne gleichzeitige Isomerisierung abzuspalten [43].

In den Biliproteinen sind die Chromophore kovalent mit dem Apoprotein durch eine Thioether-Bindung zwischen einem Cystein und $\text{C}(3^1)$ des Chromophors verknüpft (Abb. 3a) [44-47]. Eine zweite Bindungsstelle über eine der beiden Propionsäureketten von Ring B und C - z. B. durch Veresterung mit Serin - wurde [30] und wird noch diskutiert [43], konnte bisher aber nicht bewiesen werden. Dagegen gelang es, durch ^1H -NMR-Spektroskopie an Chromopeptiden einen dem PEB ähnlichen [48] und einen dem PUB ähnlichen Chromophor [42] mit 2 Peptidketten zu finden, wobei die zweite Kette an $\text{C}(18^1)$ des Ringes D über eine kovalente Thioether-Bindung gebunden ist. Ring D ist in diesen zweifach an das Protein gebundenen Chromophoren aber gleichfalls ungesättigt (Abb. 3a). Im Falle eines PC-Peptids [49] und zweier PE-Peptide [50] wird dagegen ein Chromophor mit nur einer Bindung an $\text{C}(18^1)$ vorgeschlagen. Hier soll Ring D hydriert und Ring A ungesättigt sein (Abb. 3b).

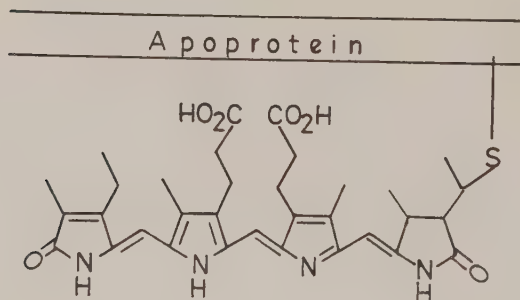
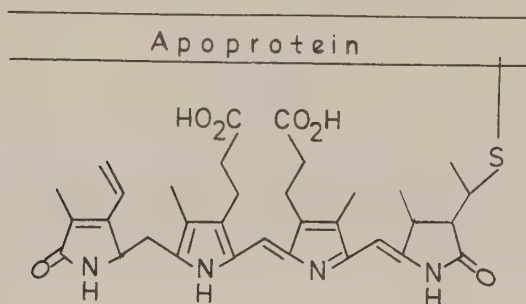
Untersuchungen zur absoluten Konfiguration der asymmetrischen Kohlenstoffatome des gebundenen Chromophors wurden nur an PCB- und PEB-Chromophoren durchgeführt, die über $\text{C}(3^1)$ mit dem Protein verknüpft sind. Alle 3 Zentren in Ring A ($\text{C}(2)$, $\text{C}(3)$, $\text{C}(3^1)$) sollen sowohl bei PCB als auch bei PEB R konfiguriert sein [51,52], $\text{C}(16)$ bei PEB soll ebenfalls die R-Konfiguration aufweisen [52].

Abb. 3:

3a: Strukturen der einfach über Ring A bzw. zweifach über Ring A und Ring D gebundenen Chromophore. (Die Konfiguration der exocyclischen Doppelbindungen ist noch nicht nachgewiesen.)



- 3b: Vorgeschlagene Strukturen für Ring D gebundene Chromophore. (Da die absolute Konfiguration noch nicht bekannt ist, wurde eine planare Schreibweise gewählt. Die Konfiguration der exocyclischen Doppelbindungen ist noch nicht nachgewiesen.)



2.2.2 Struktur der Chromoproteide

Die Einteilung der Phycobiliproteide PC und PE erfolgte zunächst nach ihrem Vorkommen in Cyanophyceen, Rhodophyceen und Kryptophyceen. Demnach unterschied man C-PC, R-PC, K-PC und C-PE, R-PE, K-PE sowie B-PE (Bangiales, eine Ordnung der Rhodophyten). Außerdem kennt man noch 4 verschiedene Formen von Allophycocyanin (APC) mit PCB als Chromophor und Phycoerythrocyanin (PEG) mit einem noch unbekannten Chromophor und

PCB. Diese Einteilung wurde beibehalten, versteht nun aber darunter verschiedene Spektraltypen, die durch Wechselwirkung des Chromophors mit dem Protein zustande kommen. [Übersicht in: 53-55]

Biliproteine setzen sich aus α - und β -Untereinheiten zusammen, in B-PE und R-PE findet man noch eine γ -Untereinheit. Die Einteilung erfolgt nach dem Molekulargewicht, wobei die α -Kette kürzer ist (~10-19 kD) als die β -Kette (~14-22 kD) und diese wiederum kürzer als die γ -Kette (~30-35 kD). Zwischen den verschiedenen PC, PE und APC besteht ein Unterschied im Molekulargewicht der Untereinheiten und der Biliproteide; Kryptophyceen-Biliproteide haben ein niedrigeres (ca. 30-50 kD), Cyanophyceen- und Rhodophyceen-Biliproteide dagegen ein höheres Molekulargewicht (200-300 kD). Auch in Art und Anzahl der Chromophore pro Untereinheit sowie in der Aggregation der Untereinheiten zu Monomeren und höheren Aggregaten unterscheiden sich die Phycobiliproteide. In den meisten PC besitzt die α -Untereinheit 1 PCB-Chromophor, die β -Untereinheit aber 2. Bei PE findet man auf der α -Kette 2 PEB-Chromophore, auf der β -Kette 3-4, wobei manchmal ein PUB enthalten ist, und auf der γ -Kette 4 Chromophore, 2 bzw. 3 PUB und 2 bzw. 1 PEB. R-PC besitzt auf der α -Kette ebenfalls zwei verschiedene Chromophore, 1 PCB und 1 PEB. Neben $(\alpha\beta)$ - und $(\alpha_6\beta_6\gamma)$ -Monomeren gibt es auch größere Aggregate wie $(\alpha\beta)_2$, $(\alpha\beta)_3$, $(\alpha\beta)_6$ und $(\alpha_6\beta_6\gamma)_6$. Auch hier unterscheiden sich die Kryptophyceen-Biliproteide von den anderen, sie bilden nur $(\alpha\beta)$ -Monomere und $(\alpha\alpha',\alpha\beta)$ -Dimere. [Übersicht in: 53-55]

Die Primärstrukturen sind für einige Biliproteide bekannt. Z. B. wurden die beiden Phycobiliproteide von Cyanidium caldarium, PC und APC, vollständig sequenziert [56-58]. Im PC besitzen die α -Kette und die β -Kette 30 % Homologie, im APC 39 %, zwischen PC und APC findet man ähnliche Werte, 26-39 %. Die Homologie ist im Bereich der Chromophor-Bindungsstellen besonders hoch.

Informationen zur Sekundärstruktur erhielt man durch Circular-Dichroismus-Messungen. Man fand im APC von Cyanidium caldarium und Phormidium luridum ~40 % α -Helix und 60 % β -Faltblatt [59,60].

Weitere Kenntnisse zur Sekundärstruktur als auch zur Tertiärstruktur lieferten Röntgenstrukturen von C-PC aus Mastigocladus laminosus [61] und C-PC aus Agmenellum quadruplicatum [62]. C-PC aus Mastigocladus laminosus besteht aus 3 identischen ($\alpha\beta$)-Untereinheiten, die so angeordnet sind, daß eine Scheibe ($\sim 3 \times 11$ nm) (x,y-Ebene) mit einer dreizähligen Achse (C_3) in z-Richtung und einem zentralen Kanal ($\varnothing \sim 3.5$ nm) entsteht. Es wird vermutet, daß diese Aggregation mit derjenigen in den Stäbchen der Phycobilisomen (vgl. 2.2.3) übereinstimmt. Die α - und β -Untereinheiten zeigen ähnliche Strukturen, jede besitzt neben irregulären Schleifen 8 Helices, wovon 6 einen globulären Teil bilden und 2 für den Kontakt innerhalb der Untereinheiten sorgen und nach außen stehen. Die Anordnung der Helices sowie die Stellung der Chromophore ähnelt derjenigen im Globin. Die Chromophore liegen in einer gestreckten Konformation vor, im Trimeren ist der kürzeste Abstand zwischen 2 Chromophoren 2.2 nm. Das PC aus Agmenellum quadruplicatum setzt sich aus $3(\alpha\beta)_6$ -Hexameren zusammen, ein Hexamer unterscheidet sich stark von den beiden anderen, die wiederum sehr ähnlich sind. In letzteren aggregieren zwei Trimere, die dem PC aus Mastigocladus laminosus gleichen, Kopf-an-Kopf zu einem Hexameren. Die hexamere Form im Kristall ist vermutlich derjenigen in den Scheiben der Phycobilisomen sehr ähnlich. Die Chromophore sind auch hier in einer gestreckten Konformation, aber mit verschiedener Geometrie aufgrund unterschiedlicher Proteinumgebung. So beeinflussen vor allem Wechselwirkungen von Arginin-Resten mit den Propionsäureseitenketten und Aspartat-Reste mit den Stickstoff-Pyrrolen die Konformation der PCB.

2.2.3 Funktion der Phycobiliproteide und Organisation der Phycobilisomen

Biliproteine fungieren als Antennenpigmente bei der Photosynthese. Ihr Absorptionsmaximum (PE ~ 540 - 575 nm, PC ~ 580 - 645 nm, APC ~ 650 - 670 nm) fällt zusammen mit der "Grünlücke" der Chlorophylle. Organismen mit Biliproteiden können daher auch noch in ökologischen Nischen, in denen der Rotanteil des Lichts weggefiltert ist (z. B. in tieferen Wasserschichten oder unter grünen Pflanzen), überleben. [Übersicht in: 53,55]

In Kryptophyceen befinden sich die Biliproteide innerhalb der Thylakoide [63,64], über die Morphologie weiß man sehr wenig. In Cyanophyceen und Rhodophyceen dagegen findet man außen, auf der dem Stroma zugewandten Seite der Thylakoide, sog. Phycobilisomen [Übersicht in: 65,66]. In diesen morphologischen Einheiten sind die Biliproteide zusammen mit Peptiden, die für den Zusammenhalt der Biliproteide und der Phycobilisomen mit der Membran verantwortlich sind, so angeordnet, daß das Licht optimal in einem strahlungslosen Energietransfer übertragen werden kann. Von außen nach innen findet man zunächst kurzwellig absorbierende Biliproteide, dann längerwellig absorbierende und ganz innen stets in kleinen Mengen APC, das die Energie auf Chlorophyll a, hauptsächlich von Photosystem II, überträgt.

2.2.4 Biosynthese

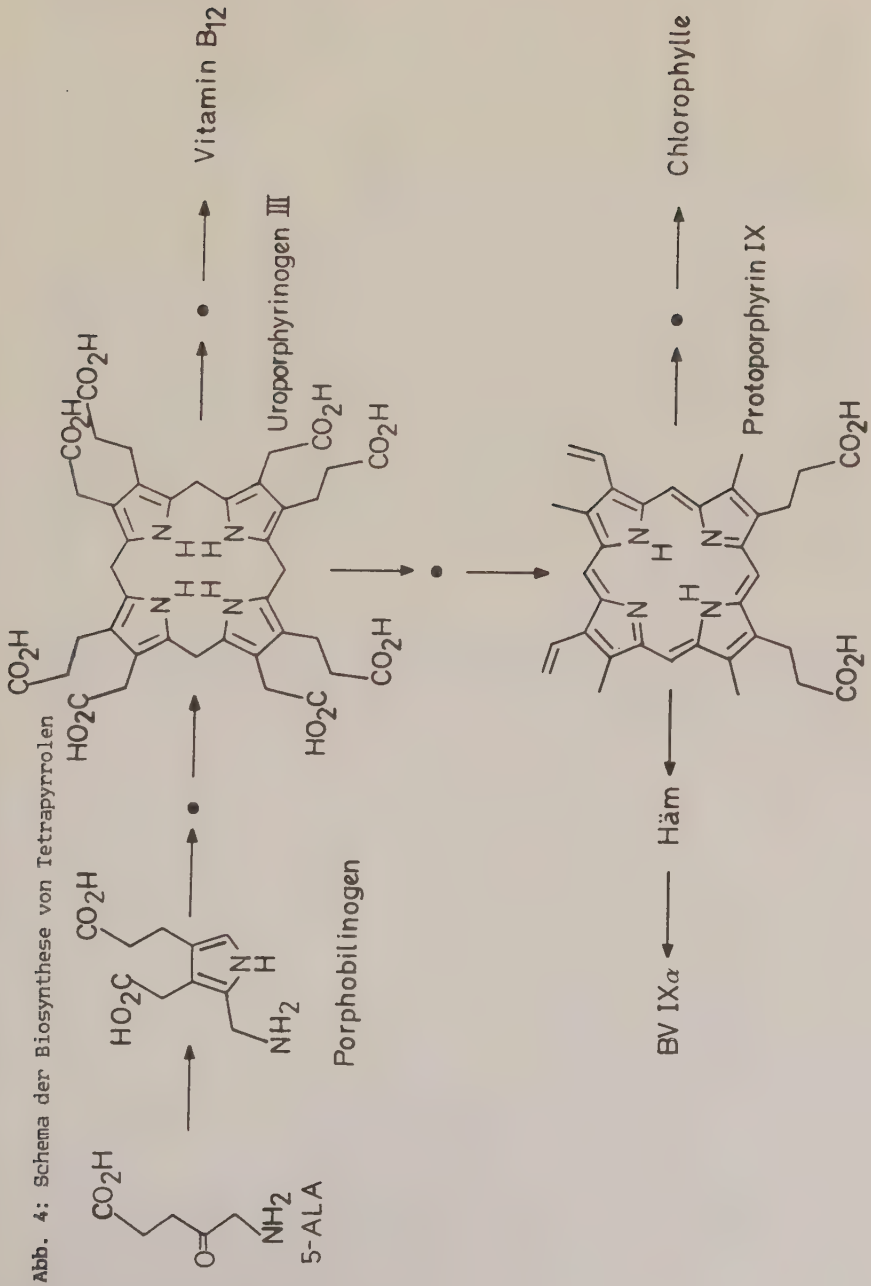
Erste Untersuchungen zur Biosynthese der Phycobiliproteide bezogen sich auf die Chromophore, bzw. sogar nur auf einen, nämlich PCB. Man nahm an, die Gallenfarbstoffsynthese in Algen könnte ähnlich verlaufen wie die in tierischen Organismen, d. h. über Porphyrine [Übersicht in: 67,68] (Abb. 4).

Erste Stufe der Porphyrin-Biosynthese ist 5-Aminolävulinsäure (5-ALA), die in Bakterien und Tieren durch Kondensation von Glycin mit Succinyl-CoA, in Pflanzen dagegen aus 2-Ketoglutarat bzw. Glutamat gebildet wird. Zwei Moleküle 5-ALA werden von der 5-ALA-Dehydratase zu einem Pyrrol umgesetzt, dem Porphobilinogen. "Kopf-Schwanz"-Kondensation von 4 Molekülen Porphobilinogen unter Eliminierung von Ammoniak durch die Porphobilinogen-Deaminase führt zu α -Hydroxymethylbilan, einem offenkettigen Tetrapyrrol. Dieses wird von der Uroporphyrinogen-III-Synthase unter Drehung von Ring D zu Uroporphyrinogen III geschlossen. Hier zweigt die Vitamin B₁₂-Biosynthese von der Chlorophyll- und Häm-Biosynthese ab. Durch schrittweises Decarboxylieren der 4 Essigsäure-Seitenketten von Uroporphyrinogen III durch eine Decarboxylase erhält man Coproporphyrinogen III, dessen Propionsäure-Ketten von Ring A und B nacheinander von der Coproporphyrinogen-Oxidase oxidativ zu Vinylgruppen decarboxyliert werden. Das gebildete Protoporphyrinogen IX wird dann im letzten Schritt der Porphyrin-Biosynthese von der

Protoporphyrinogen Oxidase zu einem Porphyrin oxidiert*, dem Protoporphyrin IX. Einbau von Magnesium in den Makrozyklus ist der erste Schritt zu den Chlorophyllen, Einbau von Eisen-II durch die Ferrochelatase liefert Häm, die prosthetische Gruppe von Hämoglobin, Myoglobin, Peroxidase, Katalase, Erythrocyruorin, Cytochrom b und P-450 und in modifizierter Form von Cytochrom a und c.

Die PCB-Biosynthese wurde vor allem in der Arbeitsgruppe von Troxler an der Alge Cyanidium caldarium untersucht. Nach Inkubation von Cyanidium caldarium mit 5-ALA [69] bzw. 4- ^{14}C -5-ALA [70] wurden aus dem Medium Porphobilinogen, 7 Porphyrine, darunter Uro-, Copro- und Protoporphyrin, sowie ein blauer Gallenfarbstoff isoliert [69]. Vergleiche der spezifischen Aktivitäten der ausgeschiedenen Pigmente und 5-ALA zeigten, daß 5-ALA, Porphobilinogen (2-fache Aktivität gegenüber 5-ALA) und Coproporphyrin (8-fache Aktivität) direkte Vorläufer des blauen Gallenfarbstoffs (8-fache Aktivität) sind [70]. Der blaue Chromophor erwies sich als identisch mit dem Methanolyse-Pigment aus PC, es handelt sich also um E-PCB [70,71]. Da beim Abbau von Häm zu BV IX α im tierischen Organismus eine Methinbrücke als Kohlenmonoxid eliminiert wird, wurden die Algen mit 5- ^{14}C -5-ALA inkubiert. Wie erwartet, fand eine ^{14}C -Kohlenmonoxidausscheidung statt und die spezifischen Aktivitäten von Kohlenmonoxid und PCB waren 1:7 [72,73]. Die beiden Laktam-Sauerstoffatome des PCB stammen - wiederum analog zu den tierischen Gallenfarbstoffen - aus zwei verschiedenen Sauerstoff-Molekülen, was durch $^{18,18}\text{O}_2/^{16,16}\text{O}_2$ -Experimente bewiesen wurde [74,75]. Schließlich gelang es, Inkubationsbedingungen zu finden, unter denen Cyanidium caldarium ^{14}C -Häm aufnahm und auch einbaute [76]. Die Aktivität war ausschließlich im Chromophor von PC zu finden, nicht jedoch im Chlorophyll. Wurde Cyanidium caldarium mit N-Methyl-Protoporphyrin IX [77] oder N-Methyl-Mesoporphyrin IX [78] inkubiert - Verbindungen, die die Ferrochelatase hemmen und somit die Häm-Synthese - so war auch die PC-Synthese gehemmt. Das heißt, daß die Biosynthese des PC-Chromophors wirklich analog der BV IX α -Biosynthese über das Häm erfolgt.

*Porphyrinogene oxidieren mit Sauerstoff spontan zu Pophyrinen



Die Herkunft des Kohlenstoffskeletts der 5-ALA in Cyanidium caldarium wurde ebenfalls durch ^{14}C -Markierungsexperimente geklärt. Wie für Pflanzen typisch, sind Glutamat und 2-Ketoglutarat Vorläufer [79,80].

Über die entscheidenden Schritte von Häm zu den Chromophoren der Phycobiliproteide war zu Beginn dieser Arbeit nichts bekannt. Neuere Literatur wird in Abschnitt 3.3.3.7 diskutiert.

Auch auf welcher Stufe und wie die Verknüpfung des Apoproteins mit dem Chromophor erfolgt, ist noch unbekannt. Durch Isolierung der m-RNA ließ sich zeigen, daß die m-RNA der Untereinheiten von PC und APC aus Cyanidium caldarium nicht polyadenyliert sind, sie waren alle in der poly(A⁻)-Fraktion enthalten [81,82]. Das spricht für eine Synthese im Chloroplasten. Nach in-vitro-Translation erhielt man die Untereinheiten von PC, deren Molekulargewicht und Aminosäuresequenz des Amino-Endes mit den in-vivo-Untereinheiten übereinstimmten, nur keinen Chromophor besaßen [81].

Zusammen mit der Beobachtung, daß Cyanidium caldarium nach Inkubation mit 5-ALA PCB ins Medium ausscheidet, kann deshalb vermutet werden, daß die Verknüpfung von Chromophor und Apoprotein einer der letzten Schritte der Biosynthese ist.

2.3 Problemstellung

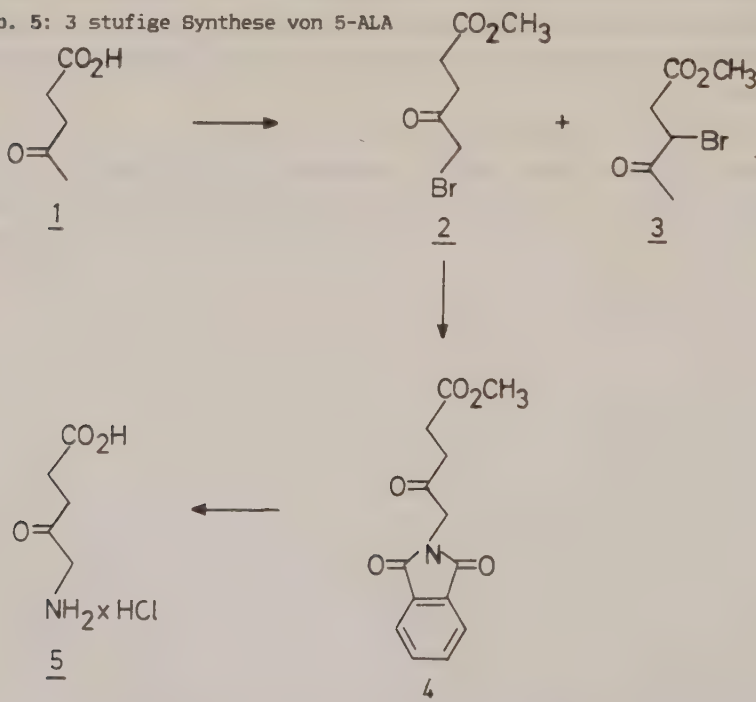
Thema der Arbeit waren Untersuchungen zur Biosynthese des PC, vor allem des Chromophors. Die in der Literatur beschriebenen Versuche (vgl. 2.2.4) waren vor allem mit Cyanidium caldarium durchgeführt worden. Nach Inkubation einer heterotroph gehaltenen Kultur mit 5-ALA wurden aus dem Medium E-PCB sowie Porphobilinogen und Porphyrine isoliert, über die Pigmente in den Zellen selbst war jedoch nichts bekannt. Es sollten deshalb Inkubationsversuche durchgeführt werden und die Pigmentzusammensetzung des Medienüberstands dünn-schichtchromatographisch verglichen werden mit der in den Zellen. Gleichzeitig sollte nach BV IX α gesucht werden, da aufgrund des Hämeinbaus [76] eine Spaltung des Häms durch ein der mikrosomalen Hämoxygenase [68] entsprechendes Enzym vermutet wurde. Weiter war auf andere Pigmente zu achten, die möglicherweise in Zusammenhang mit der Biosynthese von PCB stehen. Da für die Inkubationsversuche größere Mengen an 5-ALA benötigt wurden, sollte zuerst eine adequate chemische Synthese entwickelt werden.

3 Resultate und Diskussion

3.1 3 stufige Synthese von 5-Aminolävulinsäure-hydrochlorid (5-ALA) (5)

Alle zu Beginn dieser Arbeit bekannten Synthesen [83-85, dort weitere Literaturverweise]* waren für größere Ansätze wenig geeignet, z. B. wegen der Verwendung von Diazomethan. McDonald publizierte 1974 [86] die Bromierung von Lävulinsäure (1) in Methanol, was zu 5-Brom-Lävulinsäure-methylester (2) (ca. 60 %) und 3-Brom-Lävulinsäure-methylester (3) (ca. 40 %) führt, die destillativ getrennt werden können. Seine Vorschrift wurde reproduziert und darauf aufbauend aus der 5-Brom-Verbindung 2 nach Gabriel-Synthese und Hydrolyse des 5-Phthalimidolävulinsäure-methylesters (4) 5-ALA (5) in einer Gesamtausbeute von 33 % synthetisiert (Abb. 5).

Abb. 5: 3 stufige Synthese von 5-ALA



*1984 wurden von anderen Autoren 2 weitere 3 stufige Synthesen publiziert [87,88].

3.2 Darstellung von Vergleichsgallenfarbstoffen sowie Zuordnung der 360 MHz- ^1H -NMR-Spektren durch NOE-Experimente

3.2.1 E-Phycocyanobilin-dimethylester (E-PCBdme) (6) und trans-Methanol-Addukte 7 und 8

Bei der Inkubation von Cyanidium caldarium mit 5-ALA (5) wird - neben Porphyrinen - E-PCB ins Medium ausgeschieden [70,71]. Um dieses identifizieren zu können, mußte als Vergleichsfarbstoff E-PCB gewonnen werden. Dazu eignen sich sprüh-getrocknete Spirulina geitleri (Cyanophyceae), die einen hohen Gehalt an PC aufweisen. Das Pulver wird - nach Extraktion von Chlorophyll a und Carotinoiden mit kaltem Methanol - in Methanol unter Rückfluß gekocht, wobei der Chromophor vom Protein abgespalten wird. Neben E-PCBdme* (6) (Abb. 6) isoliert man auch 2 Methanol-Addukte, es handelt sich dabei um die diastereomeren trans-Verbindungen 7 und 8 (Abb. 7) [89], die sich nur in der Konfiguration an C(3¹) unterscheiden. Da sowohl von E-PCBdme als auch von den beiden Methanol-Addukten (die sich nicht trennen ließen) keine 360 MHz- ^1H -NMR-Spektren vorlagen, wurden diese aufgenommen und mit Hilfe von NOE-Experimenten alle Signale zugeordnet (Abb. 6, 7).

*Bei der Veresterung mit Methanol/Schwefelsäure tritt Racemisierung an C(2) ein.

Abb. 6: ^1H -NMR-Spektrum von E-PCBdme (CDCl_3 , 360 MHz)

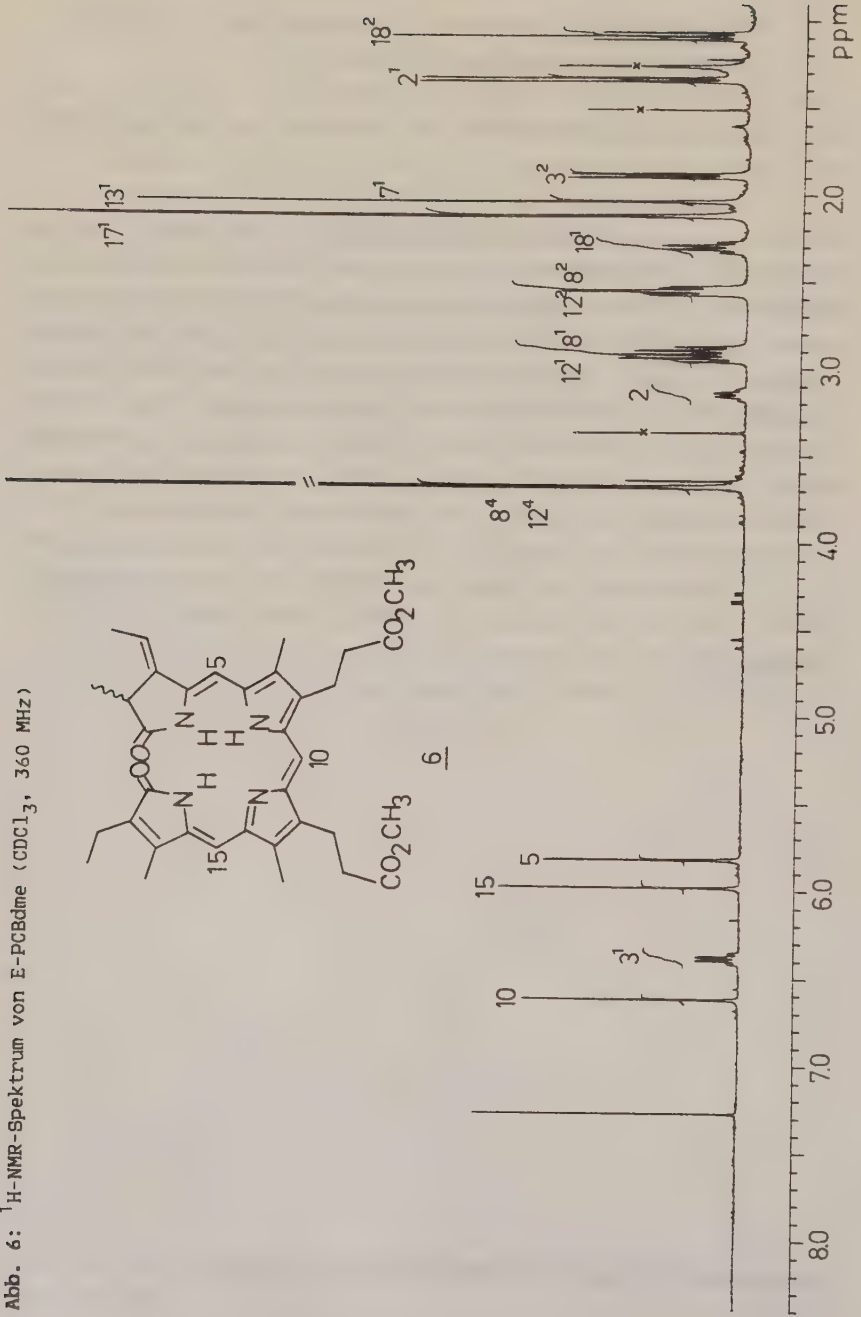
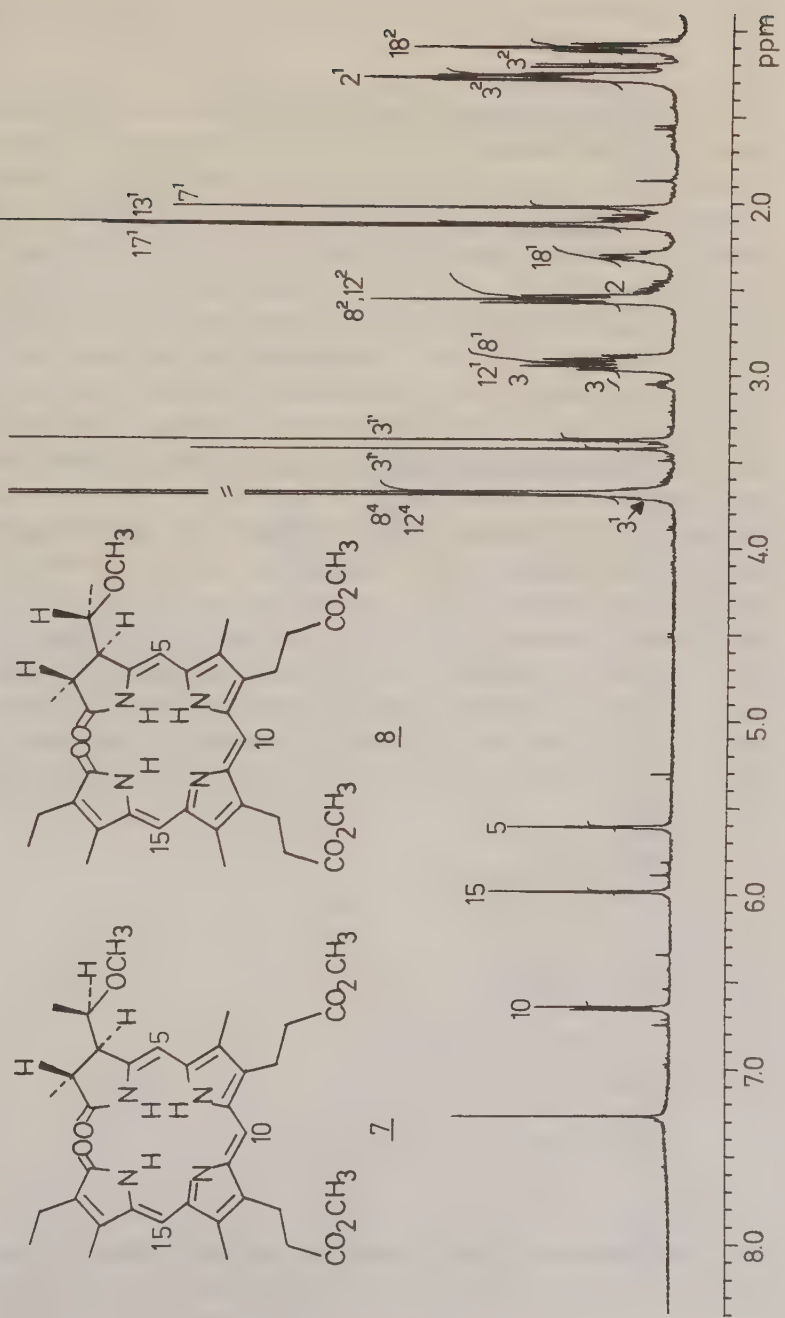


Abb. 7: ^1H -NMR-Spektrum der beiden trans-Methanol-Addukte von PCBdme (CDCl_3 , 360 MHz)



3.2.2 Biliverdin-dimethylester (BVDme) IX α (9), IX β (10), IX γ (11) und IX δ (12)

Als weiteren Vergleichsgallenfarbstoff mußte BVDme IX α (9) gewonnen werden. In Frage kam die Oxidation von Bilirubin IX α mit 2,3-Dichlor-5,6-dicyano-benzochinon unter Bildung von 9 [90] oder eine Oxidation von Hämin mit Ascorbinsäure/Sauerstoff [91], wobei man hier 4 chromatographisch trennbare Isomere isoliert: BV IX α (9), β (10), γ (11), und δ (12) (Abb. 8-11). Um weitere Vergleichsgallenfarbstoffe zu erhalten, wurde die Oxidation von Hämin bevorzugt. Von den 4 Isomeren sind in der Literatur [92-95] ^1H -NMR-Spektren mit der Zuordnung aller Signale beschrieben, jedoch sind besonders im Bereich der Methylgruppen verschiedene, sich widersprechende Zuordnungen getroffen worden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß mit verschiedenen Konzentrationen gearbeitet worden ist und/oder daß unterschiedliche Methoden für die Zuordnung verwendet worden sind (shift-Reagenzien bzw. NOE-Experimente). Kleine Unterschiede in der chemischen Verschiebung sind wahrscheinlich zurückzuführen auf verschiedene Meßtemperaturen, unterschiedlichen Wassergehalt und Protonierungsgrad der Proben, Reste von Lösungsmitteln und ebenfalls Konzentrationsunterschiede. Von den 4 Isomeren wurden 360 MHz- ^1H -NMR-Spektren aufgenommen* und alle Signale mit Hilfe von NOE-Experimenten zugeordnet (Abb. 8-11). In Tab. 1 werden die getroffenen Zuordnungen mit Literaturangaben verglichen.

*Die Spektren wurden in CDCl_3 gemessen, bei den Isomeren 10 und 12 wurde eine bessere Auflösung erreicht durch Zugabe eines Tropfens D_2O .

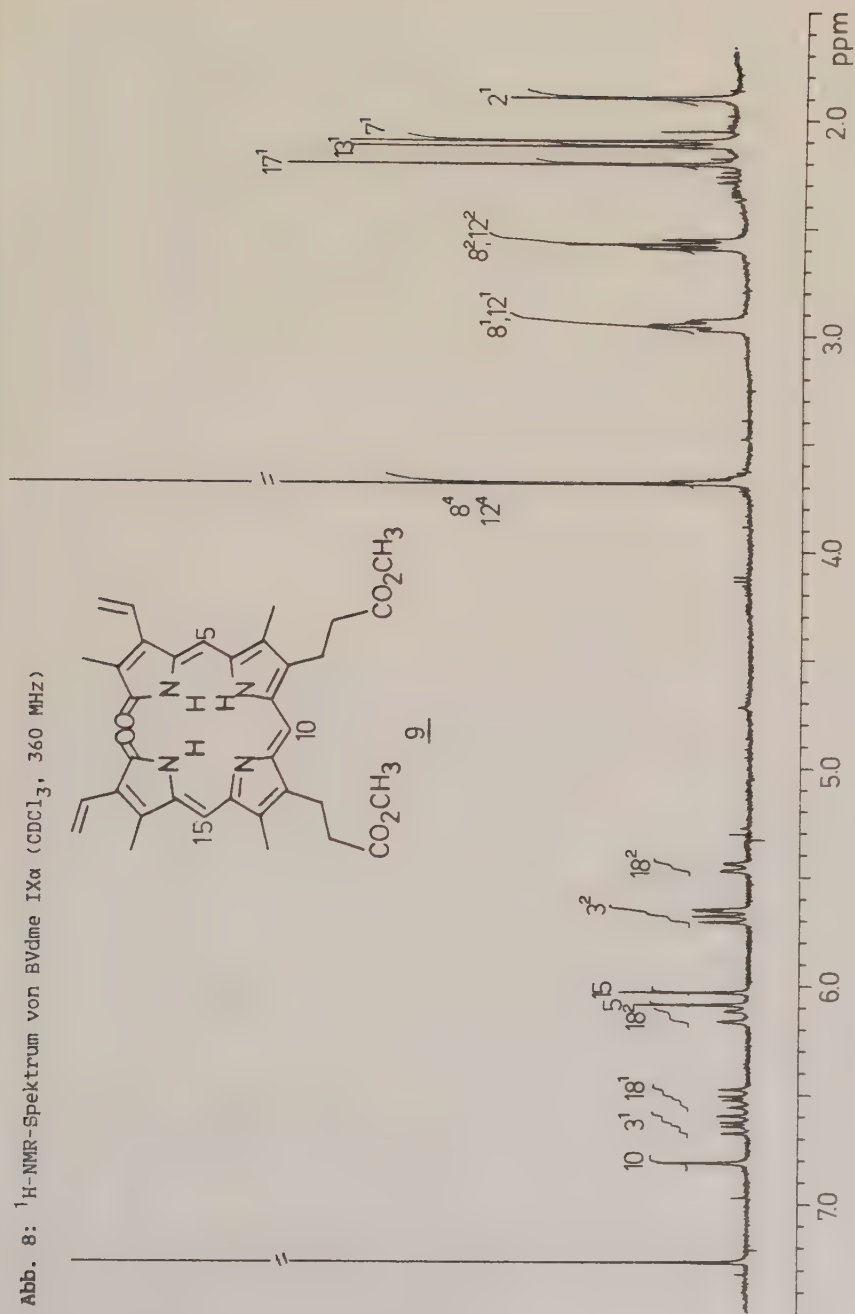
Abb. 8: ^1H -NMR-Spektrum von BVDme IXa (CDCl_3 , 360 MHz)

Abb. 9: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von BVdme IXB ($\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$, 360 MHz)

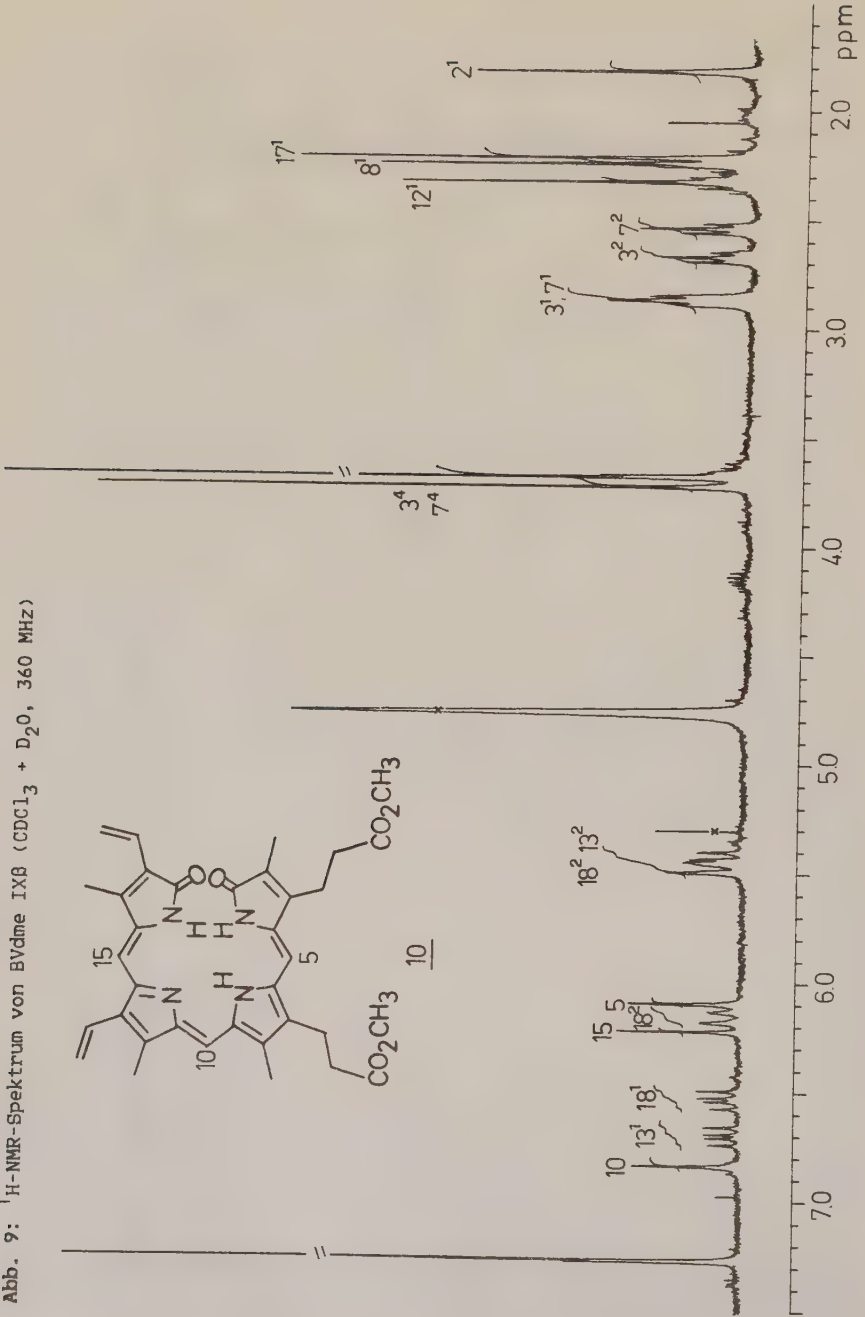


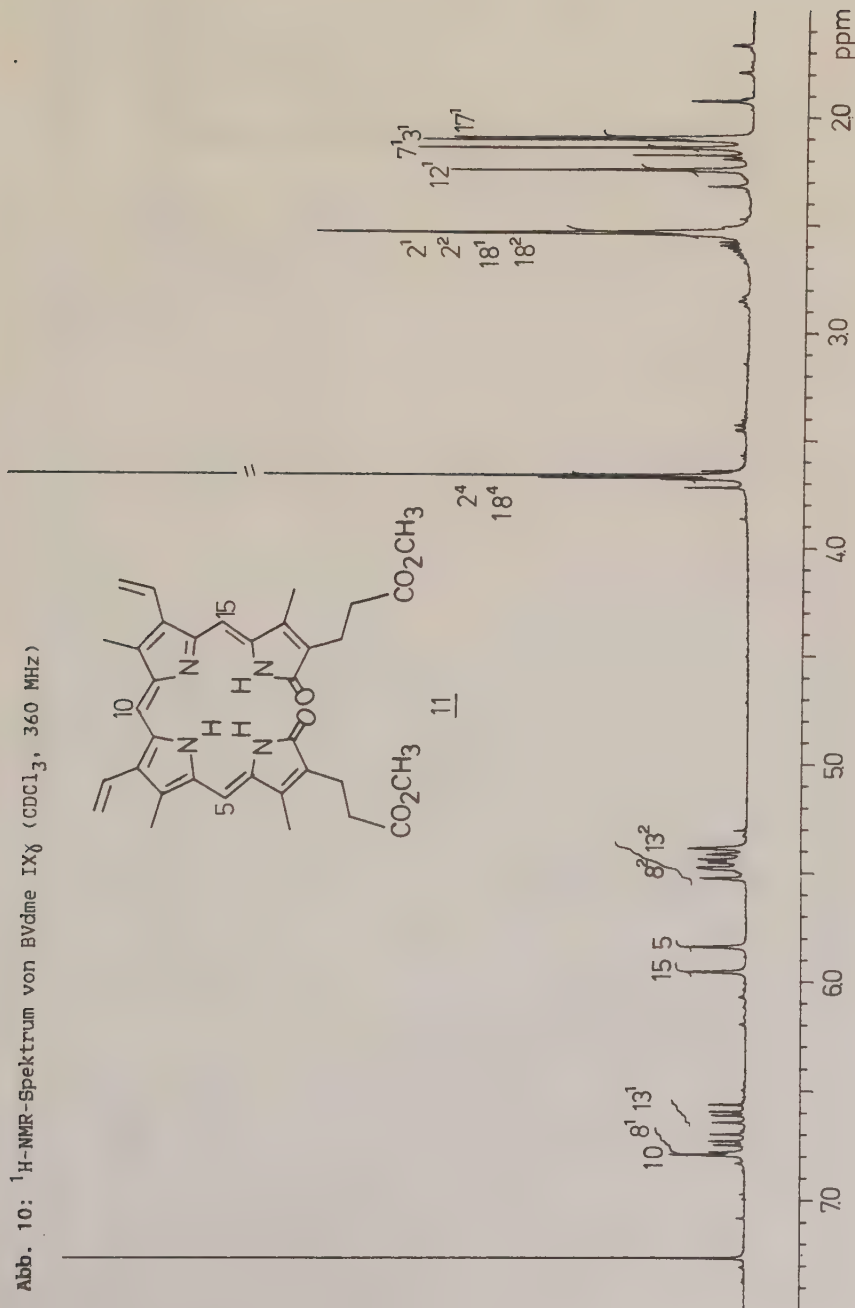
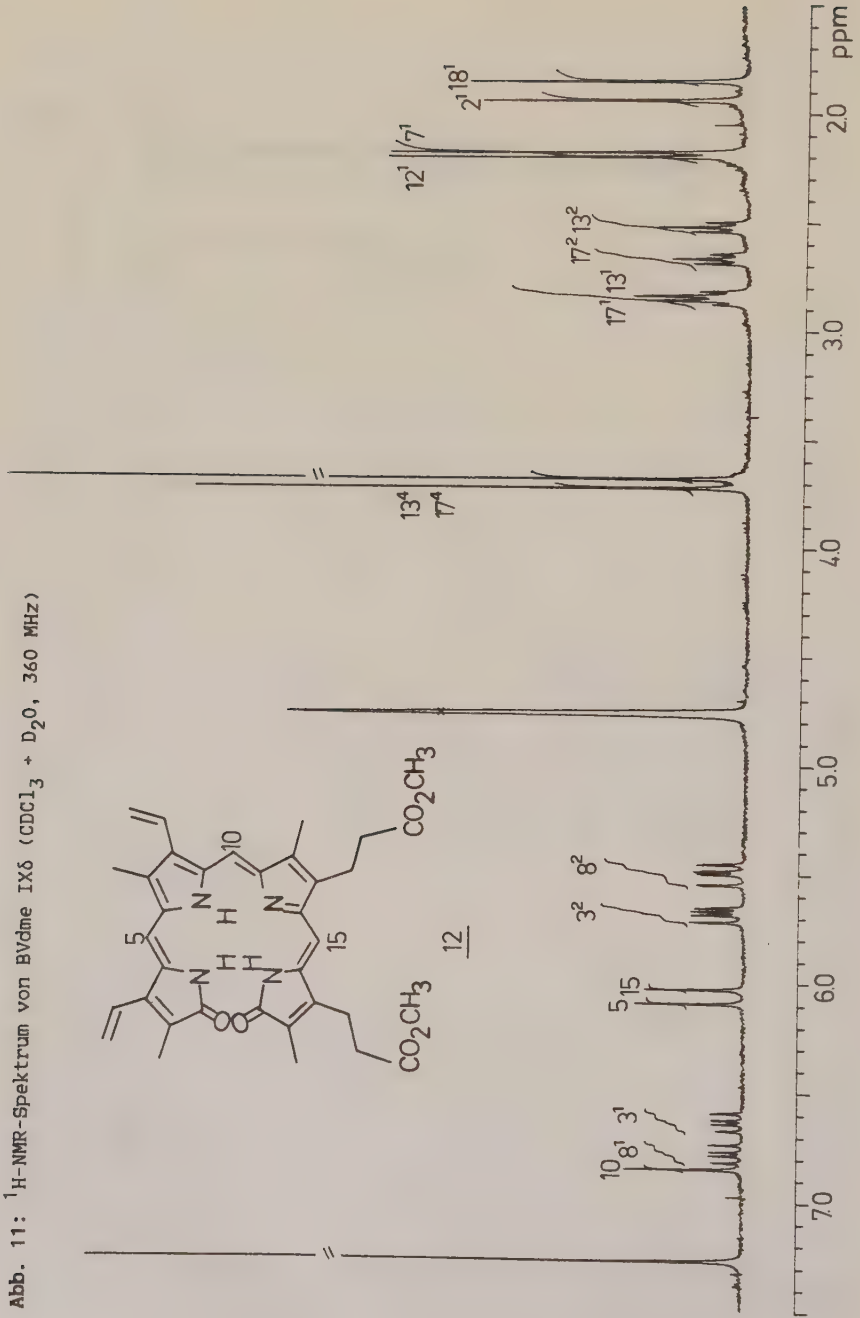
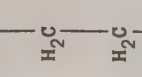
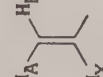
Abb. 10: ^1H -NMR-Spektrum von BVdme IX γ (CDCl_3 , 360 MHz)

Abb. 11: ^1H -NMR-Spektrum von Bvdme IXδ ($\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$, 360 MHz)



Tab. 1: Vergleich der ^1H -NMR-Daten ($\delta[\text{ppm}]$), gemessen in CDCl_3 ; *wahrscheinlichste Zuordnung

	B V d m e I X α		B V d m e I X β		B V d m e I X δ		B V d m e I X δ [95]
	[92] [93]		[94]		[94] [95]		
	360MHz 300MHz 100MHz ~0.02M 0.08M ~0.02M	360MHz 250MHz ~0.02M ~0.01M	360MHz 250MHz ~0.02M ~0.01M	360MHz 250MHz 250MHz ~0.02M ~0.01M 0.05M			
$\text{H}_3\text{C}-$	2 ¹	1.87 1.80 1.80	2 ¹	1.81 1.74	3 ¹	2.10 2.02 2.06	1.93 1.82
	7 ¹	2.08 2.06 2.04*	8 ¹	2.23 2.28	7 ¹	2.14 2.09 2.14	2.17 2.17
	13 ¹	2.11 2.14 2.02*	12 ¹	2.32 2.19	12 ¹	2.24 2.20 2.25	2.20 2.18
	17 ¹	2.19 2.09 2.12	17 ¹	2.21 2.15	17 ¹	2.09 2.00 2.08	1.84 1.90
$\text{H}_3\text{CO}-\text{C}=\text{O}$ 	8 ⁴	3.68 3.68 3.62	3 ⁴	3.72/ 3.70/	2 ⁴	3.66 3.64 3.64	3.71/ 3.72/
	12 ⁴		7 ⁴	3.67 3.66	18 ⁴		3.67 3.68
	8 ²		3 ²	2.66 2.60/	2 ²		2.52 2.64/
	12 ²	2.56 2.55 2.50	7 ²	2.53 2.48	18 ²		2.66 2.52
	8 ¹	2.94/ 2.92/	3 ¹		2 ¹	2.54 2.42 2.50	
	12 ¹	2.93 2.90	7 ¹	2.86 2.80	18 ¹		2.83 2.84
	3 ² A	5.64 5.60 5.58	13 ² A	5.42 5.37	8 ² A	5.46 5.43 5.36	5.65 5.66
	3 ² B	5.66 5.61 5.60	13 ² B	5.46 5.42	8 ² B	5.49 5.46 5.40	5.68 5.68
	3 ¹ X	6.62 6.58 6.57	13 ¹ X	6.69 6.46	8 ¹ X	6.74 6.78 6.63	6.63 6.62
	18 ² A	5.43 5.37 5.36	18 ² A	5.47 5.41	13 ² A	5.39 5.37 5.30	5.46 5.47
	18 ² M	6.12 6.06 6.06	18 ² M	6.15 6.08	13 ² B	5.41 5.44 5.32	5.52 5.53
	18 ¹ X	6.50 6.43 6.43	18 ¹ X	6.53 6.65	13 ¹ X	6.60 6.38 6.50	6.78 6.79
	5	6.06 5.99 6.00	5	6.09 6.02	5	5.84 5.71 5.78	6.09 6.05
	10	6.79 6.76 6.75	10	6.83 6.78	10	6.79 6.72 6.65	6.85 6.86
	15	6.01 5.95 5.95	15	6.22 6.16	15	5.96 5.82 5.90	6.03 6.00
							

3.3 Nachweis von Biliverdin IX α (BV IX α)(9) sowie Strukturaufklärung eines 3¹-Hydroxy-Mesobiliverdins IX α (OH-MBV) (21) aus dem Medium von Cyanidium caldarium III-D-2 nach Inkubation mit 5-Aminolävulinsäure-hydrochlorid (5-ALA)(5)

3.3.1 Cyanidium caldarium: Taxonomie, Anzucht, Inkubation, Aufschluß und Extraktion der Pigmente

Die Taxonomie der einzelligen Alge ist noch unklar, da Cyanidium caldarium biochemisch gesehen Cyanophyceen-Merkmale aufweist, so z. B. PC und APC enthält [69], morphologisch aber Rhodophyceen-Merkmale, vor allem einen Zellkern und Mitochondrien besitzt. Dies läßt sich vereinbaren, wenn man annimmt, daß es sich um eine farb- und chloroplastenlose eukaryontische Alge handelt mit einer Cyanophycee (Cyanella) als Endosymbiont, welcher die Funktion eines normalen Chloroplasten übernimmt [96].

Für Chromophoruntersuchungen eignet sich Cyanidium caldarium deshalb gut, weil die Alge heterotroph im Dunklen auf Glucose gezogen werden kann, wobei der Wildtyp kein PC und Chlorophyll a synthetisiert. Bei Inkubation mit 5-ALA beginnt nach 2-3 Tagen die Ausscheidung von Porphobilinogen, Porphyrinen und E-PCB ins Medium [69]. Die Mutante III-D-2, die in dieser Arbeit verwendet wurde, verhält sich wie der Wildtyp, produziert aber im Licht mehr Pigmente.

Für Inkubationsversuche wurde Cyanidium caldarium III-D-2 heterotroph gezogen, steril abzentrifugiert und mit frischem Glucose-Medium aufgenommen, allerdings nur 1/5 des vorherigen Volumens. Zusätzlich enthielt das Medium je nach Inkubation 5-ALA, E-PCB oder OH-MBV.

Vor dem Aufschluß wurden die Zellen mit Methanol gewaschen, um freie Pigmente, die möglicherweise außen an der Zelloberfläche adsorbiert waren, zu entfernen. Gleichzeitig wurden dabei Carotinoide und Chlorophyll a extrahiert. Anschließend wurde mit DMSO gewaschen, wobei ebenfalls Carotinoide in Lösung gingen. Der Aufschluß erfolgte in DMSO durch Ultraschall. Nach Verdünnung mit Wasser wurde abzentrifugiert und der Überstand zur Entfernung von Lipiden mit Hexan extrahiert.

Anschließend extrahierte man mit n-Butanol die Pigmente. Die Farbstoffe aus dem Medienüberstand wurden ebenfalls mit n-Butanol extrahiert. Zunächst wurde das LM im Hochvakuum nach Einfrieren der Probe schonend abgezogen. Ein Aliquot wurde jedoch am RV bei einer Wasserbadtemperatur von 45-50 °C abgezogen. Nach Veresterung erfolgte ADC auf HPTLC-Platten. Es zeigte sich, daß das Abziehen des LM am RV keinen Einfluß auf die Pigmentzusammensetzung hatte. Deshalb wurde in allen weiteren Versuchen das LM schneller und einfacher am RV abgezogen.

3.3.2 Vergleich der Pigmente aus den Zellen mit jenen aus dem Medium nach Inkubation mit 5-ALA (5)

Die in der Literatur [69] für den Medienüberstand beschriebenen Pigmente PCB und Porphyrin konnten sowohl im Extrakt des Mediums als auch in dem der Zellen identifiziert werden. Im Zellextrakt waren zusätzlich Carotinoide vorhanden. Auffallend bei beiden Proben war aber eine blaue, polare Bande ($R_f=0.37$, FM: Benzol..., vgl. 4.4.2.1), die im Medienextrakt Hauptbande war und in der Literatur nicht beschrieben ist. Daneben gab es eine schwache blaue Bande ($R_f=0.59$) über E-PCB ($R_f=0.55$) und unmittelbar unterhalb E-PCB, kaum abgetrennt, eine grüne Bande ($R_f=0.53$). Außer Carotinoiden konnten im Zellextrakt keine zusätzlichen Pigmente festgestellt werden. Da der Hauptanteil Farbstoff im Medium war, wurde für die Isolierung größerer Mengen Farbstoff nur der Medienüberstand verwendet.

3.3.3 Identifizierung von Biliverdin-dimethylester IX α (9) (BVdme IX α)

3.3.3.1 DC-Vergleich

Bei der grünen Bande unterhalb von E-PCBdme (6) handelte es sich eventuell um BVdme IX α (9). Ein Vergleich mit den 4 BVdme-Isomeren 2-12 zeigte, daß die grüne Substanz in verschiedenen FM-Systemen, in denen sich die Isomeren trennen ließen (vgl. 4.3.2), immer mit BVdme IX α (9) co-chromatographierte.

3.3.3.2 Chromsäureabbau

Einen weiteren Hinweis, daß es sich um ein BV handeln könnte und nicht um ein Abbauprodukt von PCBdme (6), brachte der Chromsäureabbau [97]. Beim Abbau von BVDme entsteht Methyl-vinyl-maleinimid (13) und Hämatinsäure-ester-imid (14), beim Abbau von E-PCBdme Methyl-ethyl-maleinimid (15), ebenfalls 14 und E-Ethyliden-methyl-succinimid (16) (Abb. 12). Die beiden Imide 13 und 15 chromatographieren nahezu gleich, unterscheiden sich aber bezüglich ihrer Fluoreszenz. Nur Imid 13 fluoresziert aufgrund der Konjugation der Vinyl-Gruppe mit der Ring-Doppelbindung unter der UV-Lampe.

Vor dem Chromsäureabbau wurden die Pigmente aus dem Medium auf einer HPTLC-Platte in einer Richtung getrennt, dann E-PCBdme und BVDme IX α als Vergleich aufgetragen und die grüne Verbindung und E-PCBdme aus dem Medium sowie die beiden Vergleichsfarbstoffe auf der Platte mit Chromschwefelsäure abgebaut. Die Imide trennte man durch Chromatographie in der zweiten Dimension. Unter der UV-Lampe war sowohl in der Spur von BVDme IX α als auch in der der grünen Bande aus dem Cyani-dien-Überstand ein fluoreszierender Fleck mit gleichem R_f (0.62) zu sehen. Die Behandlung mit Chlor/Benzidin war ebenfalls positiv, was für Imid 13 sprach. Daneben wurde noch bei beiden Verbindungen Imid 14 (R_f =0.49) identifiziert, bei PCBdme aus dem Medium und dem als Vergleich aufgetragenen PCBdme ebenfalls Imid 14, zusätzlich 15 (R_f =0.62) und 16 (R_f =0.36).

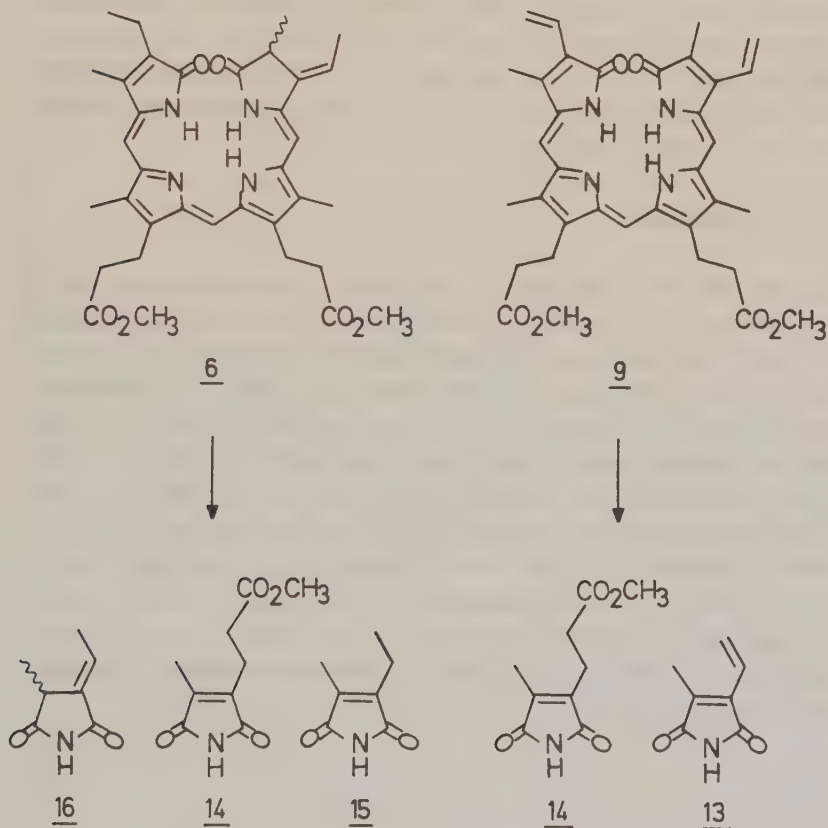
3.3.3.3 UV/VIS-Spektroskopie

Nach präparativer Abtrennung des grünen Pigments von PCBdme (6) wurden UV/VIS-Spektren in folgenden Lösungsmitteln aufgenommen: in neutralem Chloroform und Methanol, in saurem Methanol (protonierte Form) und in Methanol mit Zinkacetat (Zink-Komplex). Alle 4 Spektren waren identisch mit jenen von BVDme IX α (9), unterschieden sich aber deutlich von den Isomeren 10-12 und vor allem von E-PCBdme (6) (vgl. Tab. 2, 3.3.4.2).

3.3.3.4 Massenspektroskopie

Ein FAB-Massenspektrum des grünen Pigments zeigte einen Molekülpeak $m/e=610$, was dem Molekulargewicht von BVdme entspricht.

Abb. 12: Chromsäureabbau



Aufgrund der Ergebnisse bei der DC, des Chromsäureabbaus, der UV/VIS- und Massenspektroskopie wurde die grüne Bande unterhalb PCBdme (6) als BVdme IX α (9) identifiziert. Endgültigen Beweis für die Struktur brachte aber ein ^1H -NMR-Spektrum.

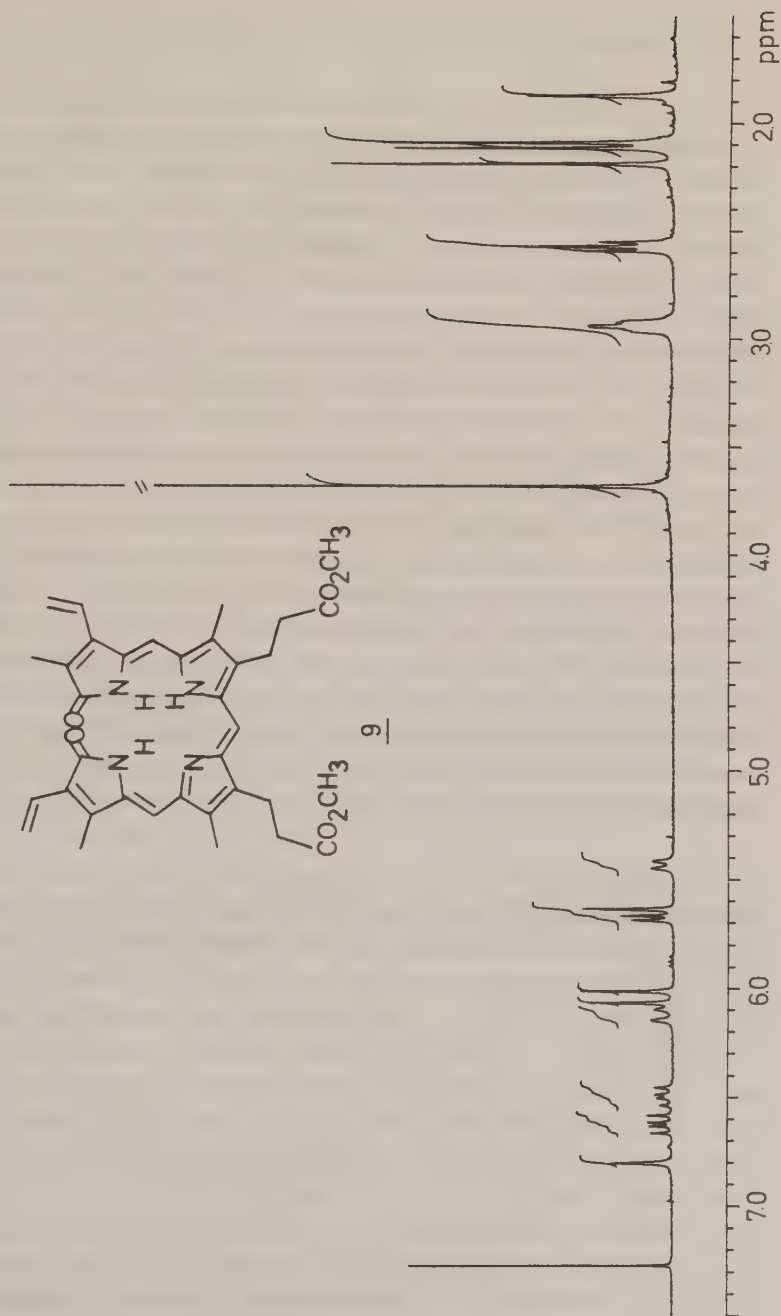
3.3.3.5 ^1H -NMR-Spektrum

Um ein ^1H -NMR-Spektrum zu erhalten, waren ca. 3 mg BVdme IX α erforderlich. Durch längere Inkubationszeiten, 1-3 Wochen, ließ sich mehr Farbstoff gewinnen. Während der Inkubation wurden die Ansätze geschüttelt, wobei sich ausschließlich BV IX α oben am Glasrand absetzte, vermutlich aufgrund der schlechten Löslichkeit in Wasser. PCB dagegen blieb in Lösung, ebenso die anderen Pigmente. Das BV IX α wurde in n-Butanol gelöst, verestert und durch PSC gereinigt. Das 360 MHz-Spektrum (Abb. 13) ist identisch mit in der Literatur [92,93] gegebenen Spektren und mit dem von BVdme IX α , das durch Spaltung von Häm in (3.2.2) gewonnen worden war.

3.3.3.6 Diskussion

Die bei Inkubation mit 5-ALA (5) beobachtete Ausscheidung von BV IX α ins Medium läßt vermuten, daß ein der mikrosomalen Hämoxygenase [3,98,99] ähnliches Enzym existiert, das Häm (17) (Abb. 14) zu BV IX α spaltet. Als Grund für die Bildung von BV IX α kommen zwei Möglichkeiten in Frage. Die Synthese von BV könnte einen Weg darstellen, um Häm, das bei Inkubation mit 5-ALA in den Zellen synthetisiert wird, aber nicht ausgeschieden werden kann, zu eliminieren. In diesem Fall wäre BV IX α also Endprodukt. Vielleicht handelt es sich aber um ein Biosynthese-Zwischenprodukt. Über noch unbekannte Zwischenstufen könnte BV IX α zum PCB bzw. zum PC-Chromophor hydriert werden. Weitere Untersuchungen zur Rolle des BV bezüglich der Biosynthese als auch zum Nachweis einer Hämoxygenase wurden in anderen Arbeitsgruppen durchgeführt (vgl. 3.3.3.7).

Abb. 13: ^1H -NMR-Spektrum von Bvdme IX α aus dem Medium von Cyanidium caldarium (CDCl_3 , 360 MHz)



3.3.3.7 Diskussion neuerer Literatur

Hinweise für eine Algen-Hämoxygenase brachten Inkubationsexperimente mit Mesohäm (18) (Abb. 14) [100]. Nach Vorinkubation einer heterotroph gezogenen Kultur von Cyanidium caldarium mit Mesohäm wurde entweder mit 5-ALA im Dunklen inkubiert, was zur Ausscheidung von PCB führte, oder aber die Ansätze ins Licht gestellt, was aufgrund von Chlorophyll a- und PC-Synthese zu Ergrünen der Algen führte. Es wurden sowohl Experimente mit ^{14}C -Häm als auch mit ^{14}C -5-ALA durchgeführt; das ausgeschiedene PCB bzw. das von PC abgespaltene war nie markiert. In beiden Fällen wurde aber Mesobiliverdin IX α (19) isoliert, das radioaktiv war. Das heißt, daß Mesohäm und Mesobiliverdin IX α keine Biosynthese-Zwischenprodukte des PC-Chromophors sind. Gleichzeitig ist es aber ein weiterer Beweis für eine Algen-Hämoxygenase, ähnlich der in Tieren, die spezifisch an der α -Position spaltet. Arbeiten mit Rohextrakten aus Cyanidium caldarium [101] und Mesohäm zeigten, daß die Algen-Hämoxygenase ebenfalls Sauerstoff und NADPH als Cosubstrat verwendet. Durch Zugabe von Ascorbat ließ sich die Aktivität steigern. Möglicherweise ist - wie bei der mikrosomalen Hämoxygenase der Tiere - zwischen Hämoxygenase und NADPH eine Cytochrom-Reduktase geschaltet. Im Gegensatz zur mikrosomalen Hämoxygenase handelt es sich um ein lösliches Enzym, falls eine Cytochrom-Reduktase vorhanden ist, muß dieses Enzym ebenfalls löslich sein.

Durch Inkubation von ^{14}C -BV IX α mit Cyanidium caldarium konnten Beale & Cornejo [102] sowie Brown et al. [103] zeigen, daß BV IX α wirklich ein Vorläufer des Chromophors von PC ist. Beale & Cornejo [104] gelang dann mit einem Rohextrakt von Cyanidium caldarium eine in-vitro-Umsetzung von BV IX α zu PCB. Bei Verwendung des Rohextraktes war nur BV IX α als Substrat erforderlich, wurde dagegen der Rohextrakt zuerst zur Entfernung niedermolekularer Substanzen über Sephadex G25 filtriert, so mußte NADPH oder NADH zugesetzt werden, wobei NADPH etwas effizienter war. Bei der in-vitro-Inkubation wurde auch die Beobachtung gemacht, daß zuerst Z-PCB (20) (Abb. 14) gebildet worden war, das sich dann zu E-PCB (6) umlagerte. Wurden unterschiedliche Mengen an Enzymrohextrakt verwendet, so nahm die Gesamtmenge an Z- und E-PCB mit steigender Enzymmenge zu. Während aber bei niedrigen Enzymkonzen-

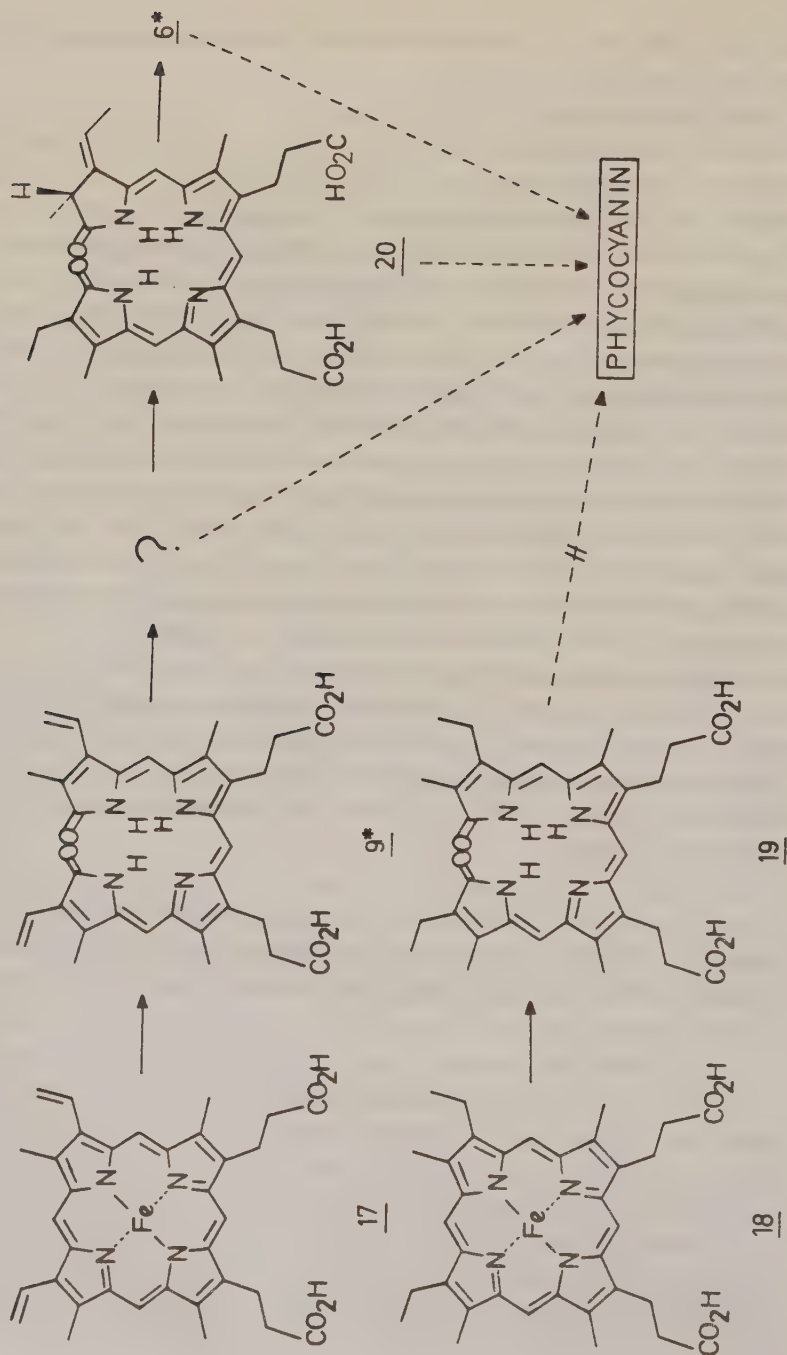
trationen mehr Z-als E-PCB vorhanden war, überwiegte bei Verwendung von mehr Enzymrohextrakt E-PCB.

3.3.3.8 Schlußfolgerungen

Während BV IX α nun als Zwischenstufe der Biosynthese des PC-Chromophors feststeht, ist die Struktur des Chromophors, der an das Apoprotein gebunden wird, noch unbekannt. Es könnte sich aufgrund der Ergebnisse der in-vitro-Inkubation [104] um Z-PCB oder E-PCB handeln (Abb. 14). Die Bildung von Z-PCB könnte aber auch durch eine spontane, chemische Umlagerung des wirklichen Vorläufers erfolgt sein. Ob die beobachtete Isomerisierung von Z- zu E-PCB enzymatisch oder chemisch erfolgt war, läßt sich nicht beantworten. Die Verschiebung in Richtung E-PCB bei Verwendung von mehr Enzymrohextrakt spricht einerseits für eine enzymatische Reaktion, andererseits lagert sich Z-PCB auch chemisch in die stabilere E-konfigurierte Verbindung um [105]. Aufgrund eigener Beobachtungen erfolgt diese Umlagerung sehr unterschiedlich, vor allem beim Arbeiten mit geringen Mengen (0.1-2 mg), und z. B. spontan während der Chromatographie. Falls also die Beobachtung, daß sich das Verhältnis von Z- zu E-PCB bei Verwendung von mehr Enzymrohextrakt umkehrt, nicht auf mehrere Parallelversuche zurückgeführt wird - was aus der Literatur [104] nicht hervorgeht -, könnte es sich nur um eine chemische und z. B. während der Chromatographie erfolgte Isomerisierung handeln.

Weitere Hinweise zur Biosynthese konnte vielleicht der polare, blaue Farbstoff, der bei Inkubation von Cyanidium caldarium III-D-2 mit 5-ALA neben Porphyrinen, BV IX α und E-PCB ausgeschieden worden ist (vgl. 3.3.2), liefern.

Abb. 14: Biosynthese-Schema (*nicht verestert)



3.3.4 Strukturaufklärung des blauen, polaren Farbstoffs 21

3.3.4.1 Vorbemerkungen

Bei Inkubation von Cyanidium caldarium III-D-2 mit 5-ALA (5) war nach 2-3 Tagen, bei beginnender Farbstoffausscheidung, der blaue, polare Farbstoff 21 Hauptpigment, während nach 5-7 Tagen mehr E-PCBdme (6) zu finden war. Das frühe Auftreten dieses polaren Farbstoffs ließ vermuten, daß es sich um ein Biosynthese-Zwischenprodukt oder um ein Umlagerungsprodukt eines Zwischenprodukts handeln könnte. Um aber ein Abbauprodukt von ausgeschiedenem E-PCB ausschließen zu können, wurde zuerst E-PCB aus Spirulina geitleri mit Cyanidium caldarium 3 Tage inkubiert. Farbstoff 21 konnte zunächst dünnschichtchromatographisch nicht nachgewiesen werden (vgl. 3.3.5). Chromophor 21 war daher interessant bezüglich der Biosynthese des PC-Chromophors. Deshalb wurde die Struktur von 21 aufgeklärt.

3.3.4.2 UV/VIS-Spektroskopie

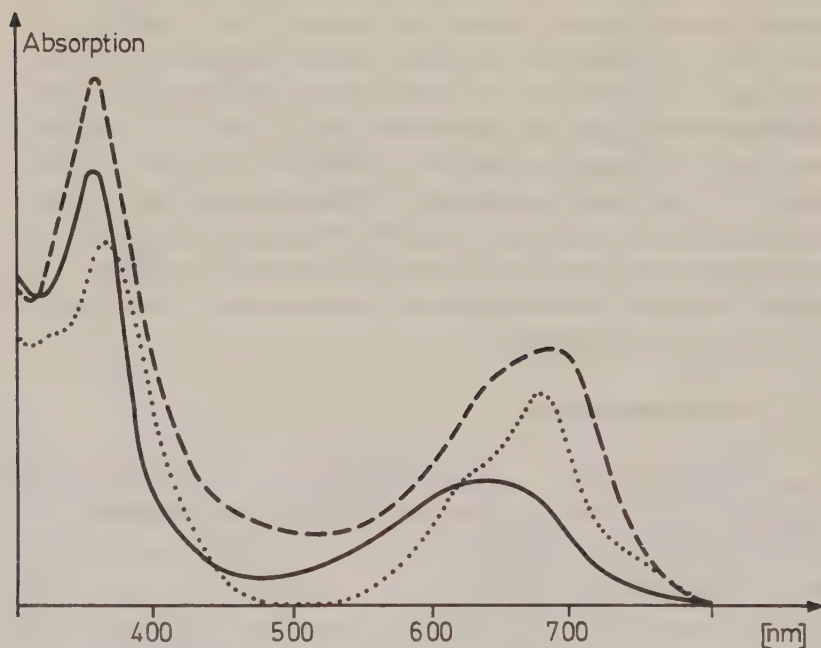
Es wurden Spektren (Abb. 15) in Chloroform und Methanol sowie in Methanol mit Schwefelsäure und Methanol mit Zinkacetat aufgenommen. In

Tab. 2: Vergleich der UV/VIS-Daten

	Choroform			Methanol			Methanol/H ⁺			Methanol/Zn ²⁺		
	$\lambda_{\text{max}}^{\text{UV}}$	$\lambda_{\text{max}}^{\text{VIS}}$	$\frac{E^{\text{UV}}}{E^{\text{VIS}}}$	$\lambda_{\text{max}}^{\text{UV}}$	$\lambda_{\text{max}}^{\text{VIS}}$	$\frac{E^{\text{UV}}}{E^{\text{VIS}}}$	$\lambda_{\text{max}}^{\text{UV}}$	$\lambda_{\text{max}}^{\text{VIS}}$	$\frac{E^{\text{UV}}}{E^{\text{VIS}}}$	$\lambda_{\text{max}}^{\text{UV}}$	$\lambda_{\text{max}}^{\text{VIS}}$	$\frac{E^{\text{UV}}}{E^{\text{VIS}}}$
<u>21</u>	370	643	3.32	365	635	3.60	356	683	2.07	370	688	1.55
<u>9</u>	380	660	3.75	374	664	3.75	376	695	3.75	378	698	1.50
<u>10</u>	379	643	3.29	374	656	3.39	374	695	1.92	384	698	1.57
<u>11</u>	375	636	3.16	370	649	3.45	356	697	1.62	377	696	2.14
<u>12</u>	376	656	2.99	371	654	2.96	365	694	1.51	380	694	2.02
<u>6</u>	366	595	2.82	365	598	2.95	375	692	1.24	375	662	1.13

Tab. 2 sind die UV/VIS-Daten von Farbstoff 21, der 4 BV-Isomere 9, 10, 11, 12 und von E-PCBdme (6) zusammengestellt.

Abb. 15: UV/VIS-Spektren von 21: — in Chloroform, --- in Methanol + H_2SO_4 , ... in Methanol + $(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Zn}$



In Chloroform und Methanol unterscheiden sich die Absorptionsmaxima aller 6 Pigmente im UV-Bereich kaum, im langwelligeren Bereich absorbiert jedoch E-PCBdme mit einem partiell hydriertem Ring um ~40-60 nm niedriger als die BV mit 4 konjugierten Ringen. Das Absorptionsmaximum des blauen Farbstoffs 21 ist 643 nm und damit im Bereich der Absorptionsmaxima der BV. Die UV/VIS-Daten der protonierten Form und des Zinkkomplexes sind für alle 6 Farbstoffe vergleichbar. Das hieß, daß es sich bei Chromophor 21 sehr wahrscheinlich um einen Gallenfarbstoff mit 4 konjugierten Ringen handelte, also um ein Verdin, das aufgrund der vergleichbaren $E^{\text{UV}}/E^{\text{VIS}}$ -Werte wie BV und PCB helical in der Z,Z,Z-Konfiguration vorliegt.

3.3.4.3 Chromsäureabbau

Der Chromsäureabbau [97] lieferte nur 2 Imide, 14 und 15. Um ein möglicherweise in sehr geringen Mengen vorhandenes drittes Imid zu finden und um das Verhältnis der gebildeten Imide zu bestimmen, wurde der Abbau mit radioaktiv markiertem Farbstoff wiederholt. Zur Gewinnung des ^{14}C -Farbstoffs 21 wurde mit 4- ^{14}C -5-ALA inkubiert, dabei wurden gleichzeitig ^{14}C -E-PCBdme (6) und ^{14}C -BVdme IX α (9) erhalten, die als Vergleichsfarbstoffe ebenfalls abgebaut wurden. Das Ergebnis von 3 Versuchen ist in Tab. 3 dargestellt. Das Verhältnis der gebildeten Imide 14 und 15 ist bei E-PCBdme und Farbstoff 21 ungefähr gleich. Während beim Abbau von E-PCBdme noch in sehr geringen Mengen Imid 16 isoliert wurde, konnte bei 21 kein drittes Imid gefunden werden. Die Menge an Imid 14 war bei allen 3 abgebauten Verbindungen vergleichbar. Daraus konnte geschlossen werden, daß der blaue Farbstoff wie E-PCBdme zwei Ringe mit je einer Methyl- und Propionsäure-Seitenkette und einen Ring mit einer Methyl- und Ethyl-Seitenkette besitzt. Der vierte Ring mußte dann eine Seitenkette haben, die für die Polarität des Farbstoffs verantwortlich war und von Chromsäure oxidiert wurde, evt. zu mehreren Verbindungen, so daß dann aufgrund der zu geringen Mengen kein Imid gefunden werden konnte.

Tab. 3: Chromsäureabbau von ^{14}C -markierten Pigmenten

	Ausbeute an Imiden			
	<u>13</u>	<u>14</u>	<u>15</u>	<u>16</u>
<u>21</u>	-	8.1 %	7.7 %	-
<u>6</u>	-	11.0 %	8.5 %	1.0 %
<u>9</u>	6.7 %	11.5 %	-	-

3.3.4.4 FAB-Massenspektroskopie

Ein in Glycerin aufgenommenes FAB-Massenspektrum zeigte einen Molekülpeak M+1 bei m/e=631 (8%) und einen Peak bei m/e=614 (4%). Diese

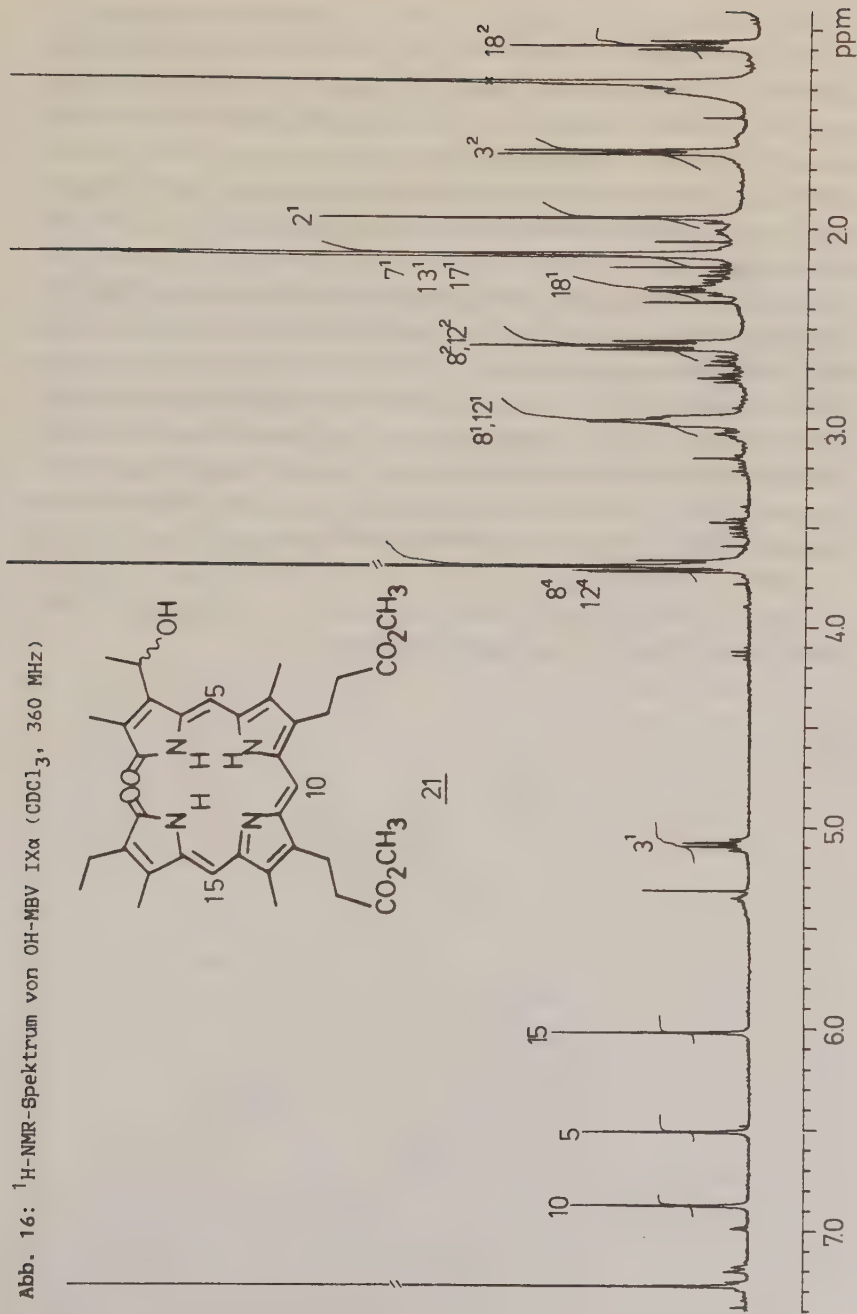
Massendifferenz von 17 kann durch das Abspalten einer Hydroxy-Gruppe erklärt werden. Das würde auch die im Vergleich zu E-PCBdme und BVDme größere Polarität bei der DC erklären. Aufgrund des Molekulargewichts von 630 und den Ergebnissen aus UV/VIS-Spektroskopie und Chromsäureabbau konnte es sich bei Farbstoff 21 um ein Hydroxy-Mesobiliverdin handeln. Ob aber die Seitenketten des vierten Rings wirklich eine Methyl- und eine Hydroxyethyl-Gruppe waren und wie die Anordnung der Ringe im Tetrapyrrol waren, konnte mit Hilfe des FAB-Spektrums nicht entschieden werden.

3.3.4.5 ^1H -NMR-Spektroskopie

Das 360 MHz- ^1H -NMR-Spektrum (Abb. 16) zeigt 3 Singulets bei 6.87, 6.50 und 6.01 ppm, die den 3 Methin-Protonen zugeordnet werden können. Die Resonanzen für die zwei erwarteten Propionsäure-methylester-Seitenketten sind bei 3.686 und 3.682 ppm (je s, $2\times -\text{OCH}_3$), 2.96, 2.95 (je t, $2\times -\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}_2\text{CH}_3$) und 2.58 ppm (t, $2\times -\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}_2\text{CH}_3$). Durch Entkoppeln ließ sich das Quartett bei 2.29 ppm und das Triplett bei 1.07 ppm der Ethyl-Seitenkette zuordnen. 4 Singulets bei 2.115, 2.120, 2.126 und 1.93 ppm sind auf 4 Methyl-Gruppen zurückzuführen. Zusätzlich beobachtet man ein Quartett bei 5.08 ppm (1H) und ein Dublett bei 1.60 ppm (3H). Entkoppeln bei 5.08 ppm führte zu einem Singulett bei 1.60 ppm. Dies deutet auf eine 1-Hydroxy-ethylgruppe hin. Das Signal für das Hydroxy-Proton war - ebenso wie die Signale für die Stickstoff-Protonen - im NMR-Spektrum nicht sichtbar, die chemische Verschiebung des Methylenprotons und auch der Methylgruppe steht aber in Einklang mit einer Hydroxygruppe, deren Existenz durch das FAB-Massenspektrum wahrscheinlich gemacht worden ist.

Die Position der Hydroxyethyl-Seitenkette und die Anordnung der 4 Ringe wurde durch NOE-Experimente aufgeklärt (Abb. 17).

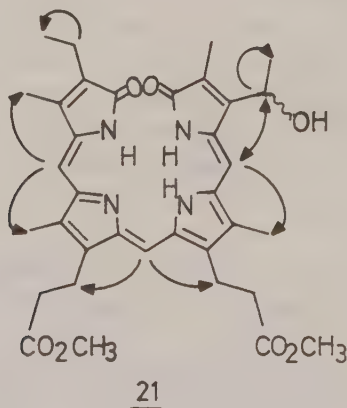
Nach Einstrahlen bei 5.08 ppm wurde ein NOE beobachtet bei 1.60 ppm (Methyl-Gruppe der Hydroxyethyl-Seitenkette), 6.50 ppm (Methin-Proton) und 1.93 ppm (Methyl-Gruppe). Da es sich dabei - aufgrund der chemischen Verschiebung - um die Methyl-Gruppe an C(2) handelt, muß die Hydroxyethyl-Seitenkette an C(3) sein. Das Signal bei 6.50 ppm kann

Abb. 16: ^1H -NMR-Spektrum von OH-MBV IXa (CDCl₃, 360 MHz)

dem Methin-Proton HC(5) zugeordnet werden. Einstrahlen in dieses Methin-Proton ergab - wie erwartet - NOE bei 5.08 ppm und zusätzlich bei 2.120 ppm. Dieses Signal entspricht daher der C(7)-Methylgruppe. Wenn auf die Methylen-Gruppe (2.29 ppm) der Ethyl-Seitenkette eingestrahlt wurde, war nur eine Signalverstärkung bei 1.07 ppm zu sehen. Das Fehlen eines Signals für eine ebenfalls erwartete Methyl-Seitenkette ist darauf zurückzuführen, daß der Einstrahlort zu nahe bei den Resonanzen der Methyl-Seitenketten liegt. Da kein Signal für ein Methin-Proton beobachtet wurde, kann der Ethylgruppe die Position C(18) an Ring D zugeordnet werden. Zwei Signale, bei 2.125 und 2.114 ppm, wurden nach Einstrahlen in das Methin-Proton bei 6.01 ppm beobachtet. Es handelt sich demnach um die beiden Methyl-Gruppen an C(13) und C(17) und um das C(15)-Methin-Proton. Wie erwartet, ergab Einstrahlen auf die mittlere Methinbrücke C(10) (6.87 ppm) eine Signalvergrößerung bei 2.95 und 2.96 ppm, d. h. die beiden Propionsäuremethylester-Seitenketten sind an Position C(8) bzw. C(12).

Bei dem blauen, polaren Farbstoff 21 handelt es sich also um ein Mesobiliverdin IX α mit einer Hydroxy-Gruppe an C(3¹).

Abb. 17: NOE-Experimente



3.3.4.6 Diskussion

Nachdem Struktur 21 bekannt war, konnte eine Beobachtung zunächst nicht erklärt werden. Chromophor 21 war nämlich - neben E-PCBdme - dünnschichtchromatographisch auch nachweisbar, wenn PC mit Pepsin abgebaut wurde, um kurzkettige Biliptide zu erhalten. Vielleicht kann der Hydroxy-Farbstoff 21 doch (vgl. 3.3.4.1) aus E-PCB gebildet werden durch Addition von Wasser an die Ethyliden-Doppelbindung sowie Oxidation von Ring A. Es wurden deshalb die Inkubationsversuche von E-PCB mit Cyanidium caldarium wiederholt, als Kontrollversuch wurde E-PCB auch in Medium bzw. nur in Wasser inkubiert. In allen 3 Ansätzen ließ sich Farbstoff 21 dünnschichtchromatographisch nachweisen, allerdings in geringen Mengen, während er im Medium von Cyanidium caldarium bei Inkubation mit 5-ALA nach kurzer Inkubationszeit stets Hauptpigment war (vgl. 3.3.2). Um die Herkunft von Farbstoff 21 im Medium von Cyanidium caldarium abzuklären, wurden Inkubationsversuche mit 5-ALA und E-PCB durchgeführt und das Verhältnis von E-PCBdme zu Hydroxy-Farbstoff 21 bestimmt.

3.3.5 Inkubation von E-Phycocyanobilin (E-PCB) und 3^1 -Hydroxy-Mesobiliverdin IXa (OH-MBV) mit Cyanidium caldarium III-D-2 sowie mit Kulturmedium

3.3.5.1 Inkubation von E-PCB und 5-ALA

0.1, 0.2 und 0.8 mg E-PCB wurden mit 90 ml einer Algensuspension bzw. mit Medium inkubiert. Je 2 Parallelproben wurden nach 1, 3 und 7 Tagen aufgearbeitet. Zusätzlich wurde Cyanidium caldarium mit 5-ALA (5) 3, 5, und 9 Tage inkubiert. Berücksichtigt man die zwei Tage bis zum Beginn der Pigmentausscheidung, so entspricht das ebenfalls 1, 3 und 7 Tagen Inkubation. Nach Isolierung, Veresterung und Trennung der Pigmente auf HPTLC-Platten wurden mit dem DC-Scanner Chromatogramme mit Integral angefertigt. Ein Vorversuch hatte gezeigt, daß bei geringer Substanzmenge die Integrale proportional zur aufgetragenen Menge waren.

In den Inkubationsansätzen Algensuspension + 0.1 mg bzw. 0.2 mg E-PCB war bereits nach einem Tag wie auch nach 3 und 7 Tagen kein E-PCB mehr im Medienüberstand. OH-MBV ließ sich nicht nachweisen, es wurden nur Porphyrine extrahiert.* Im Ansatz mit 0.8 mg E-PCB war nach 1 Tag und 3 Tagen noch sehr wenig E-PCB vorhanden, OH-MBV ließ sich bei allen 3 Proben finden. In den Kontrollansätzen mit Medium war bei allen 3 Konzentrationen E-PCB und OH-MBV enthalten.

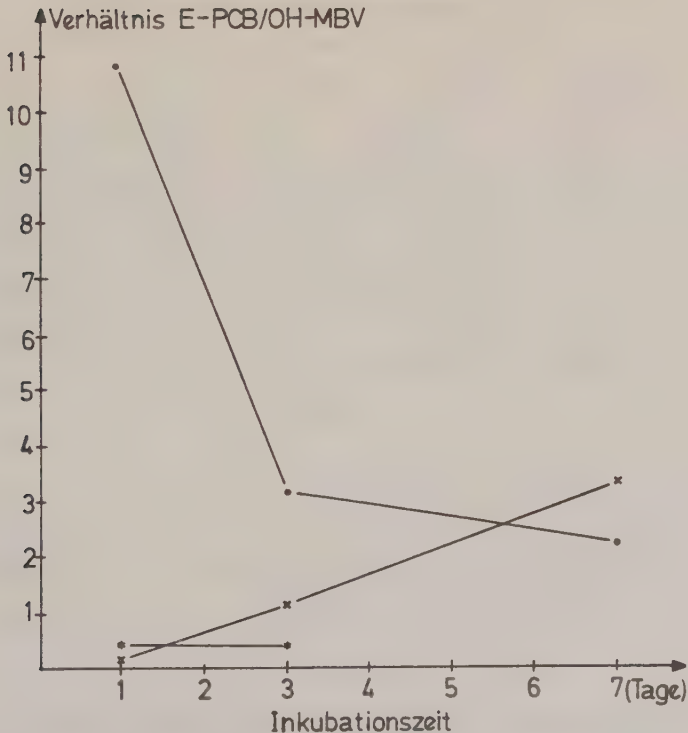
Bei der Inkubation Medium + E-PCB nimmt das Verhältnis E-PCB/OH-MBV mit der Zeit von 10.8 (1 Tag) über 3.1 (3 Tage) zu 2.2 (7 Tage) ab (Abb. 18). Diese Abnahme war von der eingesetzten Menge an E-PCB unabhängig. Im Falle der Inkubation Algensuspension + 0.8 mg E-PCB betrug das Verhältnis bereits nach 1 Tag 0.34 und verringerte sich dann auf 0.31 (3 Tage) (Abb. 18). Eine Zunahme fand dagegen bei Inkubation einer Algensuspension mit 5-ALA statt. Während einen Tag nach Beginn der Pigmentausscheidung mehr OH-MBV als E-PCB vorhanden war (E-PCB/OH-MBV = 0.2), überwiegte nach 3 Tagen E-PCB bereits leicht (1.1), nach 7 Tagen deutlich (3.3) (Abb. 18). Die Abnahme im Falle der E-PCB-Inkubation war aufgrund der Bildung des OH-MBV aus E-PCB zu erwarten.

*Porphyrine findet man auch bei heterotropher Anzucht.

Eine mögliche Erklärung für den 5-ALA-Inkubationsversuch wird später diskutiert (3.3.5.4).

Abb. 18: E-PCB/OH-MBV-Verhältnis nach 1, 3 und 7 Tagen Inkubation. (Im Falle der 5-ALA-Inkubation bezieht sich die Inkubationsdauer auf die ausgeschiedenen Pigmente, bezüglich 5-ALA waren es 3, 5 und 9 Tage.)

- Medium + E-PCB (Mittelwerte aus 3 verschiedenen Ansätzen (0.1, 0.2 und 0.8 mg E-PCB), je 2 Parallelproben)
- Algensuspension + E-PCB (Mittelwerte aus 2 Parallelproben (0.8 mg E-PCB))
- × Algensuspension + 5-ALA (Mittelwerte aus 2 Parallelproben)



Vergleicht man die Menge an OH-MBV in den Inkubationsansätzen Medium + 0.8 mg E-PCB und Algensuspension + 0.8 mg E-PCB, so zeigt sich, daß im Verlauf der Inkubation bei beiden eine Abnahme stattfindet, die aber unterschiedlich groß ist. Betrachtet man für jeden Ansatz die nach 1 Tag vorhandene Menge an OH-MBV* als 100 %, so findet im Ansatz Medium + E-PCB eine leichte Abnahme von 93 % (3 Tage) auf 81 % (7 Tage), im Ansatz Algensuspension + E-PCB eine größere von 62 % (3 Tage) auf 18 % (7 Tage) statt (Abb. 19). Dafür gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten. Im Medienansatz ist während des ganzen Zeitraumes von 7 Tagen E-PCB vorhanden. Bezogen auf die noch vorhandene Menge E-PCB nach 1 Tag findet man nach 3 Tagen noch 42 %, nach 7 Tagen noch 14 %. D. h., daß OH-MBV ständig nachgebildet werden kann. Im Algenansatz dagegen findet man schon nach 1 Tag nur noch rund 5 % der Menge, die im Medienansatz vorhanden ist, eine weitere Bildung des OH-MBV kann deshalb nach 1 Tag ausgeschlossen werden. Während in letzterem Fall die starke Abnahme des OH-MBV auf die Instabilität des Chromophors zurückgeführt werden kann, resultiert die schwächere Abnahme im ersten Fall aus einer Überlagerung von Abbau und Neubildung. Eine zweite Erklärung, die möglicherweise gleichzeitig eine Rolle spielt, wäre die Aufnahme des gebildeten OH-MBV durch die Algen. Auf eine solche Aufnahme kann wahrscheinlich auch das Verschwinden von E-PCB in den 3 Ansätzen Algensuspension + E-PCB zurückgeführt werden. Diese Fragen wurden durch weitere Versuche beantwortet. Zum einen wurde OH-MBV mit Medium bzw. Algensuspension inkubiert, zum anderen wurden die Zellen zum Nachweis der Aufnahme von E-PCB und OH-MBV aufgeschlossen.

3.3.5.2 Inkubation von OH-MBV

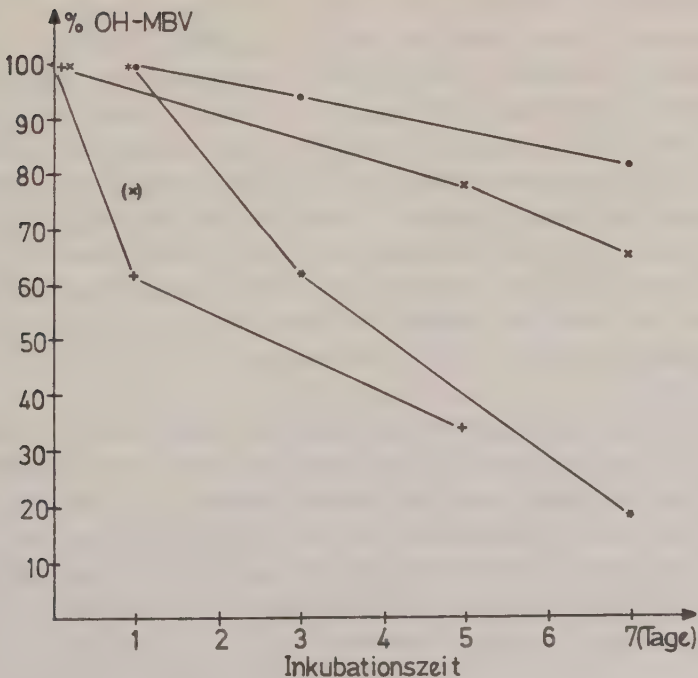
Je 0.2 mg OH-MBV wurden mit 90 ml einer Algensuspension 1 Tag bzw. 5 Tage inkubiert, außerdem je 0.2 mg mit 90 ml Medium 1 Tag, 5 und 7 Tage. Die nach der Inkubation noch vorhandene Menge an Farbstoff wurde durch UV/VIS-Spektroskopie bestimmt.

*Die Menge an OH-MBV nach 1 Tag Inkubation von E-PCB beträgt im Algenansatz verglichen mit derjenigen des Mediumansatzes ungefähr die Hälfte.

Bei der Inkubation von OH-MBV mit Medium fand innerhalb 7 Tagen eine Abnahme auf 65 % der eingesetzten Menge statt (Abb. 19). Bei der Inkubation mit Algen war auch hier die Abnahme größer. Bereits nach einem Tag waren nur noch 61 %, nach 5 Tagen noch 34 % der eingesetzten

Abb. 19: Vergleich der Abnahme des OH-MBV

- * OH-MBV, das während der Inkubation von E-PCB + Algensuspension gebildet worden war; die Menge nach 1 Tag Inkubation wurde 100 % gesetzt
- OH-MBV, das während der Inkubation von E-PCB + Medium gebildet worden war; die Menge nach 1 Tag Inkubation wurde 100 % gesetzt
- + OH-MBV + Algensuspension; die eingesetzte Menge wurde 100 % gesetzt
- × OH-MBV + Medium; die eingesetzte Menge wurde 100 % gesetzt



Menge vorhanden (Abb. 19). Ob der Farbstoff von den Algen aufgenommen worden war, sollte Aufschluß der Zellen zeigen.

3.3.5.3 Aufschluß der Algen

Um nur außen an der Zelloberfläche adsorbierte Pigmente zu entfernen, wurden die Algen zunächst mit Methanol gewaschen. Nur sehr geringe Mengen Farbstoff konnten so erhalten werden. ADC nach Veresterung zeigte, daß nur Carotinoide extrahiert worden waren. Nach Aufschluß der Zellen ließen sich im Falle der E-PCB-Inkubation dünnenschichtchromatographisch E-PCB und OH-MBV nachweisen, im Falle der OH-MBV-Inkubation nur dieser. Quantitatives Arbeiten war aber aufgrund zu kleiner Mengen nicht möglich.

3.3.5.4 Diskussion

Cyanidium caldarium III-D-2 nimmt also bei Inkubation sowohl E-PCB als auch OH-MBV aus dem Medium auf. Die Aufnahme des E-PCB erfolgte schneller als die des OH-MBV. So waren 0.2 mg E-PCB bereits nach 1 Tag vollständig aufgenommen, im gleichen Zeitraum dagegen erst rund 40 % von 0.2 mg inkubiertem OH-MBV. Da die Inkubationsversuche mit E-PCB und OH-MBV aber nicht parallel, sondern nacheinander durchgeführt wurden, kann diese Beobachtung evtl. auch auf geringfügig veränderte Bedingungen zurückgeführt werden. Wie die Aufnahme der beiden Gallenfarbstoffe erfolgt, ob durch passiven oder aktiven Transport, ist nicht untersucht worden. Auch bei der in der Literatur beschriebenen Aufnahme von Häm [76], Mesohäm [100] bzw. BV IX α [102,103] werden keine Angaben zum Transport-Mechanismus gemacht.

Ebenfalls nicht beantwortet werden kann die Frage nach der Herkunft des OH-MBV im Medium von Cyanidium caldarium III-D-2 bei Inkubation mit 5-ALA. Teilweise wird der Farbstoff sicher durch Addition von Wasser und Oxidation des synthetisierten PCB gebildet. Eine weitere Möglichkeit wäre ein noch unbekanntes Intermediat der Biosynthese, das ebenfalls durch Umlagerung OH-MBV bilden kann. Eine enzymatische Bildung von OH-MBV wird nicht vermutet.

Im Falle eines weiteren, in der Literatur beschriebenen Hydroxy-Mesobiliverdins wird dagegen eine enzymatische Bildung angenommen. Aus Ovarien der Meeresschnecke Turbo cornutus wurde ein Hydroxy-Mesobiliverdin IX α isoliert [12]. Im Gegensatz zu OH-MBV 21 besitzt dieser Turboverdin genannte Chromophor aber eine zum Ring β -ständige Hydroxygruppe, also eine HO-CH₂-CH₂-Seitenkette. Bei beiden MBV befindet sich diese Seitenkette an C(3), d. h. an Ring A. Dieses Turboverdin (22) wurde NMR-spektroskopisch mit OH-MBVdme (21) aus dem Medium von Cyanidium caldarium verglichen.

3.4 Gallenfarbstoffe aus der Meeresschnecke Turbo cornutus

3.4.1 Turboverdin (22)

Turboverdin (22) wurde mit Salzsäure/Aceton aus gefriergetrockneten Ovarien der Meeresschnecke extrahiert [12], verestert und durch PSC gereinigt. Das ^1H -NMR-Spektrum ist in Abb. 20 dargestellt. Zwei Triplets bei 3.94 und 2.77 ppm mit je 2 Protonen koppeln miteinander und können der $\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2$ -Seitenkette an C(3) zugeordnet werden. Während bei Chromophor 21 das Methin-Proton an C(5) aufgrund der Nachbarschaft zur Hydroxy-Gruppe um ca. 0.5 ppm zu tieferem Feld verschoben ist, stimmt bei Farbstoff 22 die chemische Verschiebung von HC(5) mit jener der BVdme-Isomeren 9-12 überein. Alle weiteren Signale sind vergleichbar mit Farbstoff 21. Die für das Turboverdin vorgeschlagene IX α -Struktur [12] konnte durch NOE-Experimente bestätigt werden.

Im Rahmen der Synthese eines möglichen Biosynthese-Zwischenprodukts von PCB wurde die Struktur von Turboverdin durch eine Totalsynthese (Synthese-Schema vgl. 4.5.2) ebenfalls bestätigt. Das ^1H -NMR-Spektrum von synthetischem 22 ist in Abb. 21 dargestellt.

Bei der PSC des Aceton/Salzsäureextrakts aus den Ovarien von Turbo cornutus fiel neben dem beschriebenen Turboverdin ein auf der Platte dunkelblauer Farbstoff 23 auf, im verwendeten Fließmittel (Methylenchlorid/Essigsäure-ethylester = 1:1) polarer als Turboverdin, sowie in sehr geringen Mengen ein grünes Pigment, apolarer im Vergleich zu Turboverdin. Bei Letzterem wurde vermutet, daß es sich um ein Abbauprodukt handelt und wurde zunächst nicht weiter untersucht (vgl. 3.4.3). Die Menge an Chromophor 23 erschien jedoch für eine Strukturklärung ausreichend.

3.4.2 Strukturaufklärung von Farbstoff 23

3.4.2.1 Verhalten bei der DC

Im Fließmittelsystem Methylenchlorid/Essigsäure-ethylester = 1:1 chromatographierte Farbstoff 23 auf HPTLC-Platten unterhalb von Turboverdin und zeigte eine dunkelblaue Farbe. Beim Eluieren mit Aceton schlug jedoch die Farbe sofort nach violett um. Erneute ADC zeigte, daß der Farbstoff unverändert war. Nach PSC auf Kieselgel mit Fluoreszenzindikator blieb jedoch Chromophor 23 auch während des Eluierens blau. Im Gegensatz zur violetten Lösung, die eine schwache Fluoreszenz zeigte, fluoreszierte diese blaue Lösung nicht. Bei Verwendung von Kieselgel ohne Fluoreszenzindikator chromatographierte der Farbstoff violett und hatte einen größeren R_f -Wert als Turboverdin. Eine wahrscheinliche Erklärung dieser Beobachtungen konnte nach der UV/VIS-Spektroskopie gegeben werden.

3.4.2.2 UV/VIS-Spektroskopie

Die UV/VIS-Spektren (Abb. 22) von violettem 23 in Chloroform und Methanol waren sehr ähnlich, jeweils ein Maximum im sichtbaren Bereich bei 572 nm bzw. 560 nm. Im UV-Bereich gab es nur einige sehr schwache Absorptionen. Nach Zugabe von Säure zur Methanollösung schlug die Farbe nach blau um, das langwellige Maximum verschob sich bathochrom nach 624 nm, die Intensität wurde ebenfalls größer. In Methanol mit Zinkacetat war die Farbe ebenfalls blau, das Maximum lag bei 600 nm, die Intensität gegenüber neutralem Methanol war größer, gegenüber saurem Methanol aber kleiner. Diese Verschiebungen von Absorptionsmaxima und Erhöhung der Intensität sind typisch für durchkonjugierte Verdine. Nicht erklärt werden konnte allerdings das Fehlen eines UV-Maximums. Weitere Informationen, vor allem ob es sich bei Chromophor 23 um einen Gallenfarbstoff handelte, sollte der Chromsäureabbau liefern.

Mit Hilfe der UV/VIS-Spektren ließ sich aber das Chromatographieverhalten erklären. Die blaue Verbindung nach der PSC auf Kieselgel mit Fluoreszenzindikator zeigte das gleiche UV/VIS-Spektrum wie der

Abb. 20: ^1H -NMR-Spektrum von natürlichem Turboverdin (CDCl_3 , 360 MHz)

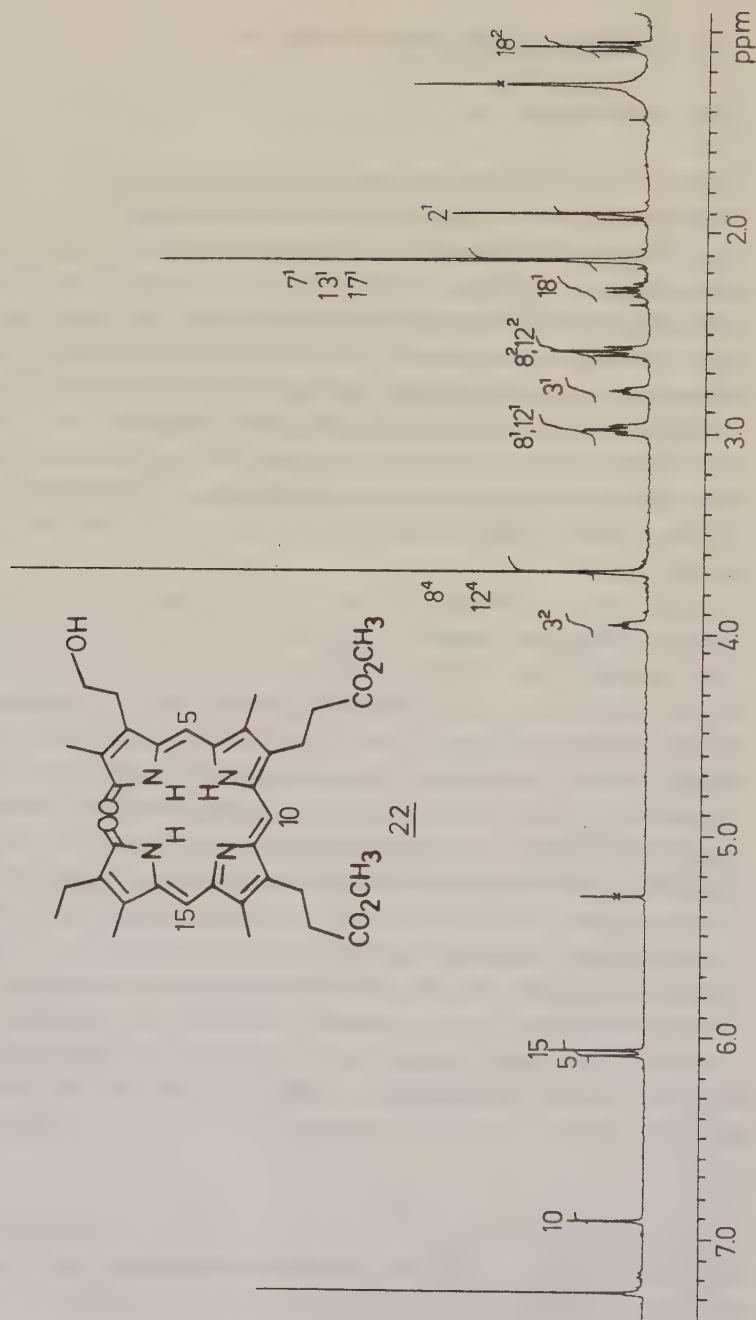
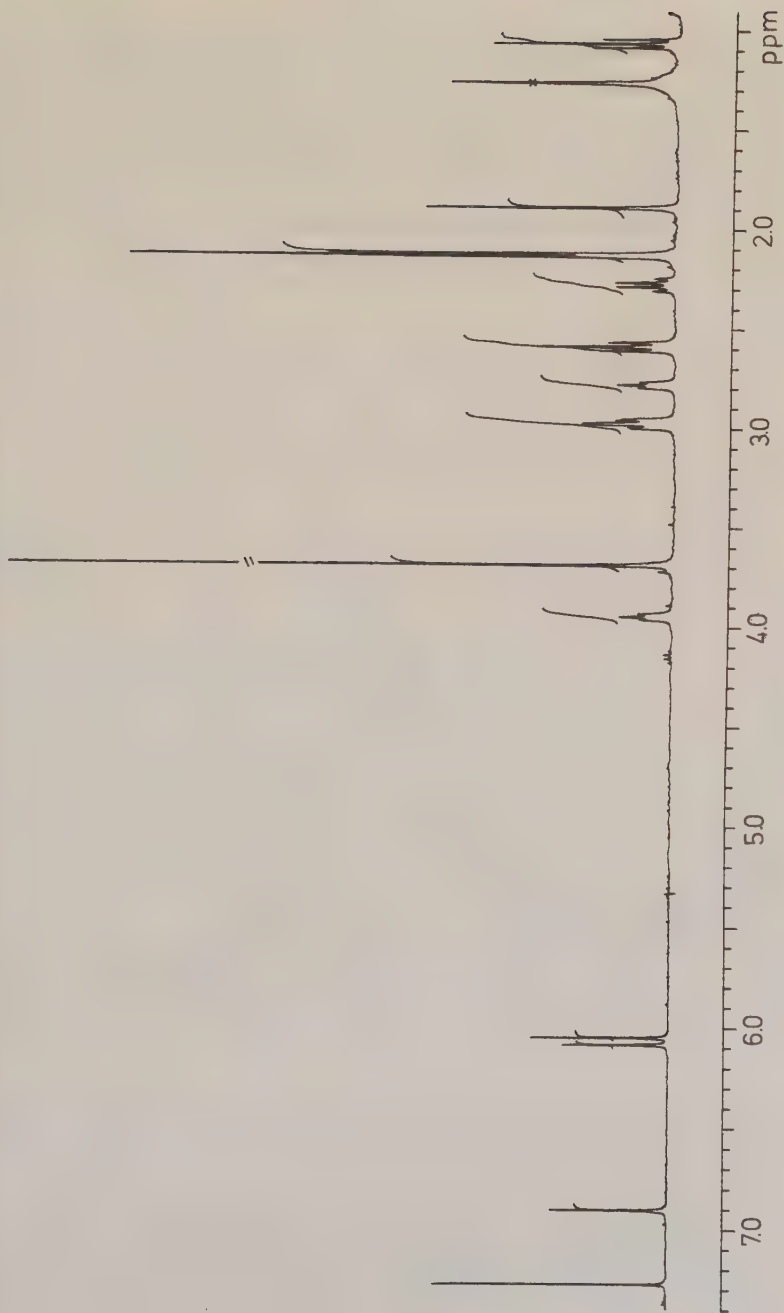
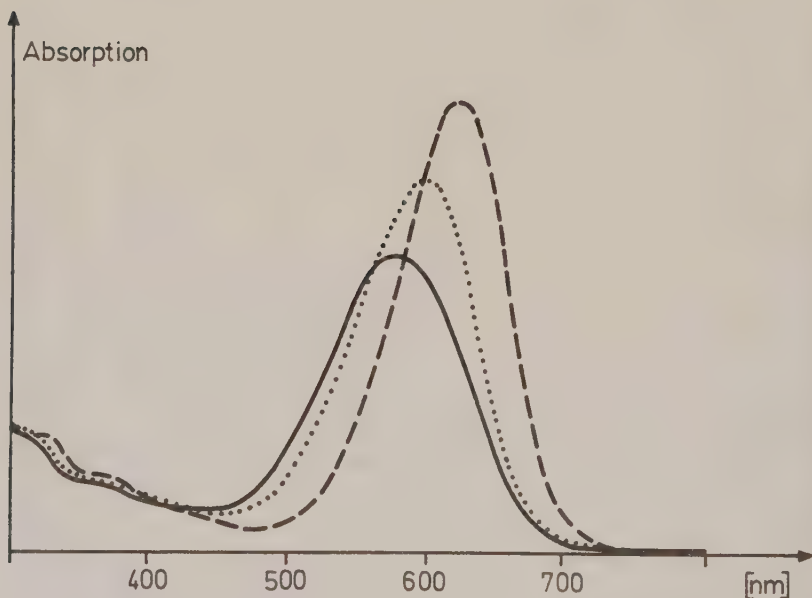


Abb. 21: ^1H -NMR-Spektrum von synthetischem Turboverdin (22) (CDCl_3 , 360 MHz)



Zinkkomplex in Methanol. Falls es sich bei der blauen Form von 23 wirklich um den Zinkkomplex handelte, sollte man durch Behandeln mit Säure und Neutralwaschen wieder die nicht komplexierte Form erhalten. Dies gelang tatsächlich, sowohl bei der blauen Verbindung, die nach PSC erhalten worden war, als auch nach Zugabe von Zinkacetat zur violetten methanolischen Lösung. Die blaue Farbe auf HPTLC-Platten war vermutlich auf Protonierung zurückzuführen.

Abb. 22: UV/VIS-Spektren von 23: — in Chloroform, ---- in Methanol + H_2SO_4 , in Methanol + $(CH_3CO_2)_2Zn$



3.4.2.3 Chromsäureabbau

Nach Chromsäureabbau wurden dünnschichtchromatographisch die Imide 13 und 14 identifiziert. Möglicherweise war ein drittes, polareres Imid vorhanden, wegen der geringen Menge konnte es sich aber auch um ein Artefakt handeln. Aufgrund des Chromsäureabbaus sollte es sich bei

Verbindung 23 um einen weiteren Gallenfarbstoff handeln.

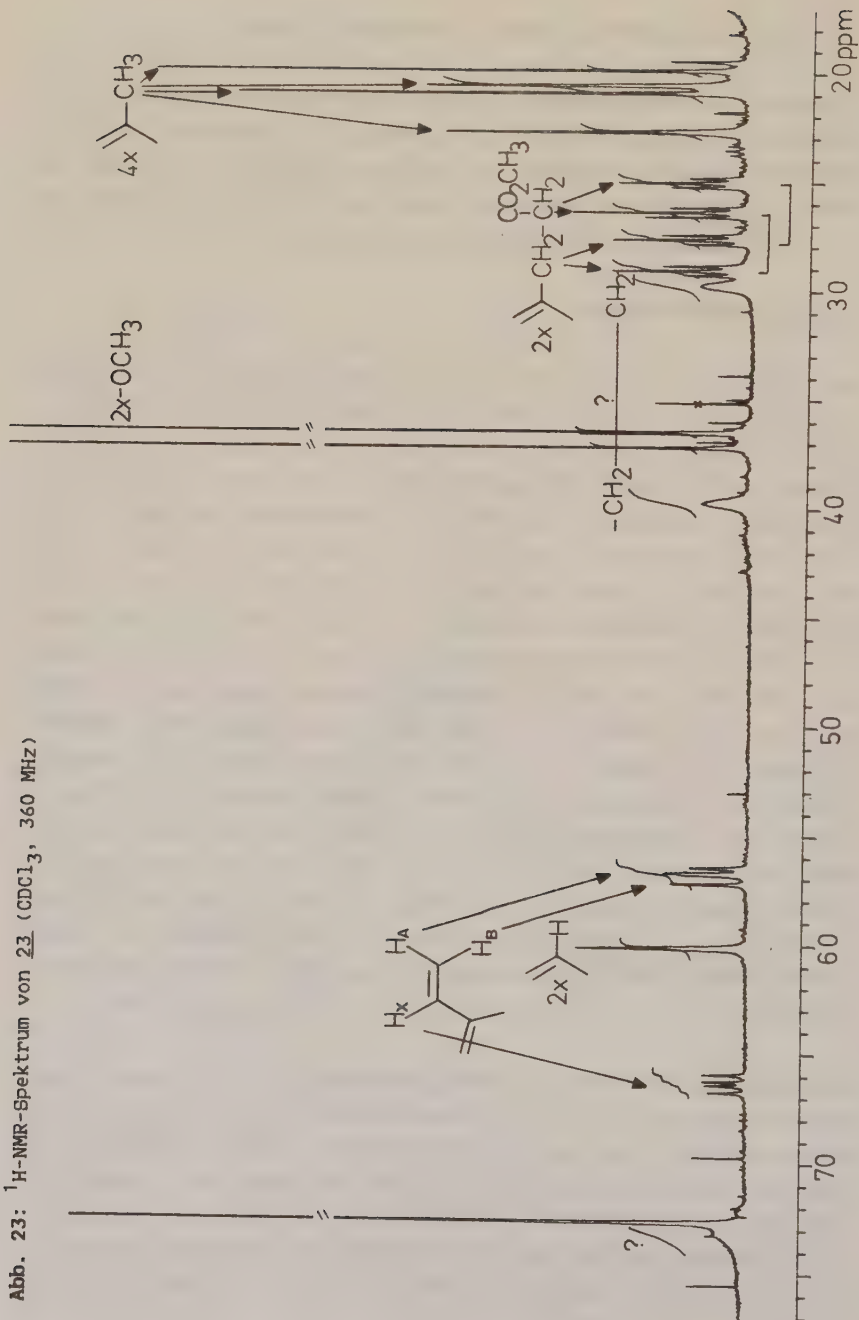
Versuche, das Molekulargewicht und andere Strukturhinweise mittels Massenspektroskopie zu ermitteln, führten zunächst weder durch EI-Massenspektroskopie noch durch FAB-Massenspektroskopie in Glycerin zum Erfolg. Aufgrund des Substanzverlustes bei der Massenspektroskopie wurden deshalb zuerst NMR-Experimente durchgeführt.

3.4.2.4 ^1H -NMR-Spektrum

Das ^1H -NMR-Spektrum (Abb. 23) zeigte die aufgrund des Chromsäureabbaus erwarteten Signale für eine Vinylgruppe (ABX-System) bei 6.63 ppm (H_X) und 5.70 (H_B) bzw. 5.65 (H_A), ferner waren 2 Propionsäure-methylester-Seitenketten vorhanden, 2 Singulets bei 3.71 und 3.64 für die Methylester und 4 Triplets, jedes 2 Protonen entsprechend. Das Triplet bei 2.90 zeigte Kopplung mit dem Triplet bei 2.63 ppm, die beiden anderen bei 2.76 und 2.49 koppelten ebenfalls. 4 Singulets bei 2.25, 2.09, 2.04 und 1.98 ppm wurden aufgrund des Integrals und der chemischen Verschiebung 4 Methylgruppen zugeordnet. Zwei weitere, breite Signale bei 3.95 und 2.94 ppm (je 2 Protonen) zeigten eine sehr schwache Kopplung. Das Signal bei 6.00 ppm konnte durch Zugabe von 1 Tropfen d_6 -Aceton in 2 Singulets bei 6.02 und 6.00 ppm aufgespalten werden, aufgrund der chemischen Verschiebung und des Integrals (je 1 Proton) wurden sie als Protonen der Methin-Brücken identifiziert. Daneben waren noch weitere Signale vorhanden, die aber wahrscheinlich auf Verunreinigungen zurückzuführen waren. Im Bereich des Chloroform-Signals (ca. 7.30 ppm) wurde manchmal ein Signal beobachtet, teils scharf, teils sehr breit und dadurch kaum mehr sichtbar. Es wurde zunächst vermutet, es könnte sich um ein Stickstoff-Proton handeln.

Aufgrund der UV/VIS-Spektren war als Struktur ein Violin (Absorptionsmaximum von Mesobiliviolin im langwelligen Bereich ist 560 nm [106]) vermutet worden, also ein Gallenfarbstoff mit 3 konjugierten Ringen, wobei der vierte über eine Methylen-Brücke verbunden ist. Signale für diese Brücke und dem Proton an Ring 4 konnten jedoch nicht gefunden werden. Aufgrund der Seitenketten (4x Methyl-, 2x Propionsäure-methylester-, 1x Vinyl-) handelte es sich aber sehr wahrscheinlich um einen

Abb. 23: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 23 (CDCl_3 , 360 MHz)



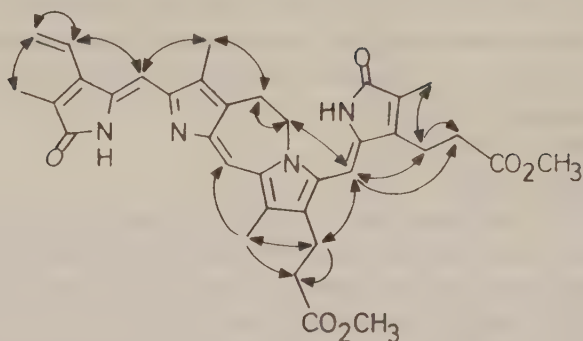
Gallenfarbstoff mit 4 Ringen. Da nur 2 Methin-Protonen identifiziert worden waren, blieb zunächst die Frage nach der Verknüpfung zwischen 2 Ringen und nach der 8. Seitenkette. Als nicht zugeordnete Signale standen noch die beiden breiten, schwach miteinander koppelnden Resonanzen zur Verfügung. Weitere Hinweise brachten NOE-Experimente.

3.4.2.5 NOE-Experimente

Mit Hilfe der NOE-Experimente (Abb. 24) konnten zunächst Teilstrukturen ermittelt werden. Benachbart zum Methin-Proton bei 6.02 ppm ist die Vinyl-Gruppe und die Methyl-Gruppe bei 2.04 ppm. Die Methyl-Gruppe bei 2.09 ppm ist am gleichen Ring wie die Vinyl-Gruppe, möglicherweise an einem Endring, A oder D, da bei Einstrahlen in das Signal dieser Methyl-Gruppe nur das Signal des H_B der Vinyl-Gruppe zu sehen war. Das zweite Methin-Proton bei 6.00 ppm hat sicher eine Propionsäure-Seitenkette (t bei 2.90 und 2.63 ppm) als Nachbar, diese wiederum zeigte wechselseitig NOE mit der Methyl-Gruppe bei 1.98 ppm. Einstrahlen bei 1.98 ppm gab nur eine schwache Signalverstärkung bei 2.90 ppm, ob das auch auf die Nachbarstellung zu einem Laktam-Sauerstoff zurückzuführen war, erschien zunächst fraglich, da fast alle bisher gefundenen Gallenfarbstoffe IX α -Isomere sind mit den beiden Propionsäure-Seitenketten an den mittleren Ringen. Der zweite Nachbar des Methin-Protons bei 6.00 ppm war aufgrund eines schwachen NOE's vermutlich die zweite Propionsäure-Seitenkette. Allerdings war noch ein zweiter, schwacher, aber wechselseitiger NOE mit dem breiten Signal bei 3.94 ppm vorhanden. Einstrahlen bei 3.94 ppm gab auch eine schwache Signalverstärkung bei 2.95 ppm, Einstrahlen in diese Resonanz wiederum NOE bei 3.95 ppm und bei 2.04 ppm. Sättigung dieses Methyl-Signals zeigte neben einem NOE bei 6.02 ppm auch einen sehr schwachen bei 2.95 ppm. Wurde bei 2.25 ppm (Methyl-Gruppe) eingestrahlt, so wurde Signalverstärkung für die beiden Triplets bei 2.76 und 2.49 ppm und überraschenderweise bei 7.30 ppm beobachtet.

Dieses Signal, das nicht in jedem aufgenommenen 1H -NMR-Spektrum zu sehen war, war zunächst auf ein Stickstoff-Proton zurückgeführt worden. Möglicherweise handelte es sich aber dabei um ein Methin-Proton. Bei Z,Z,Z-konfigurierten Verdinen liegt das Signal für die mittlere

Abb. 24: NOE-Experimente

23

Methin-Brücke um 6.8 ppm, die Resonanzen der beiden anderen Methin-Protonen aber wie bei Farbstoff 23 um 6.0 ppm. Wenn das Signal bei 7.30 ppm also tatsächlich auf ein Methin-Proton zurückzuführen war, dann sollte ein Deuterium-Austausch negativ sein und es mußte einen Grund für eine Tieffeld-Verschiebung von ~0.5 ppm geben. Ein Austausch gegen Deuterium gelang tatsächlich nicht und als Ursache für die Verschiebung kam eine Isomerisierung der Methin-Brücke von Z nach E in Frage [107]. Bisher sind aber nur Z,E,Z-Verdine mit einer zusätzlichen Brücke zwischen den beiden mittleren Ringen bekannt*. Diese Brücke ließ sich auch nachweisen. Die breiten Signale bei 2.95 und 3.94 ppm wurden aufgrund der NOE-Experimente und der chemischen Verschiebung einer -CH₂-CH₂-Brücke zwischen C(8) an Ring B und dem Stickstoff N(23) an Ring C zugeordnet. Damit waren alle Signale des ¹H-NMR-Spektrums sowie alle Ergebnisse der NOE-Experimente interpretiert. Die beiden Propionsäure-Seitenketten sind wirklich beide zur Methin-Brücke C(15) benachbart, d. h. Chromophor 23 ist ein IXδ-Isomeres. Formal erhält man aus BV IXδ durch Isomerisierung an C(10) und Addition des Stickstoffs von Ring C an die C(8)-Vinyl-Gruppe Chromophor 23.

*In Hexamethylphosphorsäuretriamid als LM soll vor allem bei 2,3-Dihydro-Gallenfarbstoffen eine Population mit (4Z,9E,15Z)-5syn,10anti,14syn-Geometrie vorliegen [108].

Eine derartige Reaktion ist in der Literatur beschrieben. Photochemisch [95] oder auch durch Kochen in Methanol [14] läßt sich BV IX δ zu sog. Neobiliverdin (NBV) IX δ isomerisieren, dessen Struktur mit jener von Chromophor 23 identisch sein sollte.

3.4.2.6 Isomerisierung von BVdme IX δ (12) zu NBVdme IX δ (23)

BVdme IX δ wurde in Methanol bei 100-110°C zu NBVdme IX δ isomerisiert [14]. Das Produkt war spektroskopisch (^1H -NMR-Spektrum: Abb. 25) identisch mit Farbstoff 23, der aus den Ovarien von Turbo cornutus isoliert worden war.

3.4.3 Identifizierung von BV IX δ (12)

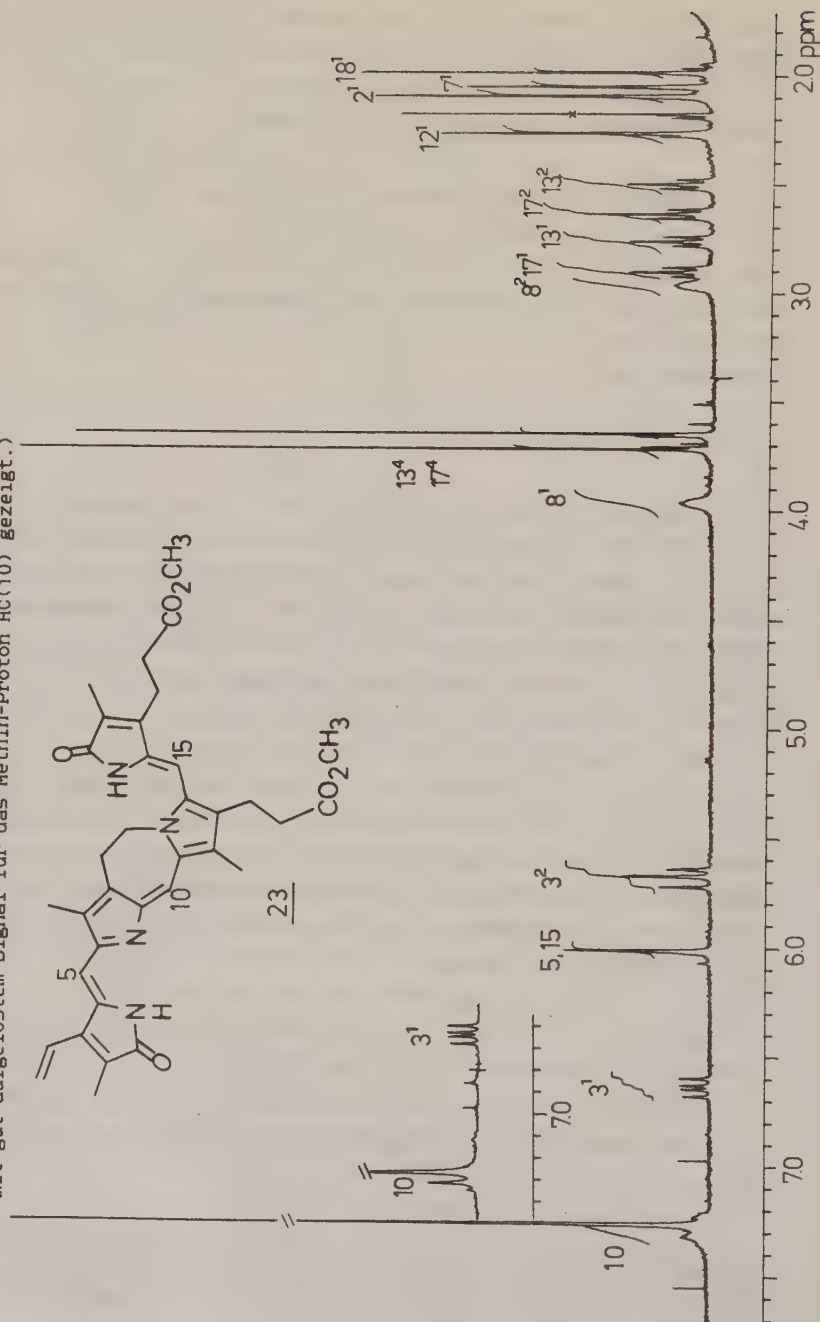
Als Biosynthese-Vorläufer von NBV IX δ wurde BV IX δ vermutet. Neben Turboverdin (22) und NBV IX δ (23) war bei der PSC des Ovarien-Extrakts auch ein grünes Pigment vorhanden gewesen, das aber zunächst als Abbauprodukt betrachtet worden war (vgl. 3.4.1). ADC in verschiedenen Fließmittelsystemen, in denen sich die 4 BV-Isomere 9-12 trennen ließen, zeigte, daß das grüne Pigment aus Turbo cornutus stets mit 12 co-chromatographierte. Die UV/VIS-Spektren, gemessen unter 4 verschiedenen Bedingungen (Chloroform, Methanol, Methanol + H_2SO_4 , Methanol + $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Zn}$), waren ebenfalls mit 12 identisch. Der Chromsäureabbau ergab wie bei allen BV die Imide 13 und 14 und ein FAB-Massenspektrum zeigte einen Molekülpeak bei 610. Obwohl die Substanzmenge für ein ^1H -NMR-Spektrum nicht ausreichte, kann aufgrund der anderen Übereinstimmungen mit 12 das grüne Pigment aus Ovarien von Turbo cornutus als BV IX δ (12) identifiziert werden.

3.4.4 Diskussion

In den Ovarien von Turbo cornutus sind 3 Gallenfarbstoffe enthalten. Turboverdin liegt nativ als Chromoproteid vor [11], ob das auch für BV IX δ und NBV IX δ zutrifft, wurde nicht untersucht.

Interessant sind vor allem die IX δ -Isomere des BV bzw. NBV, deren natürliches Vorkommen noch nicht beschrieben ist. Die bisher bekannten

Abb. 25: ^1H -NMR-Spektrum von synthetischem **23** (CDCl_3 , 360 MHz) (Ausschnittsweise wird ein anderes ^1H -NMR-Spektrum mit gut aufgelöstem Signal für das Methin-Proton HC(10) gezeigt.)



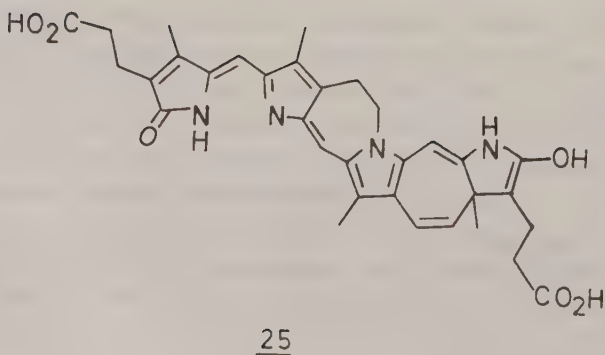
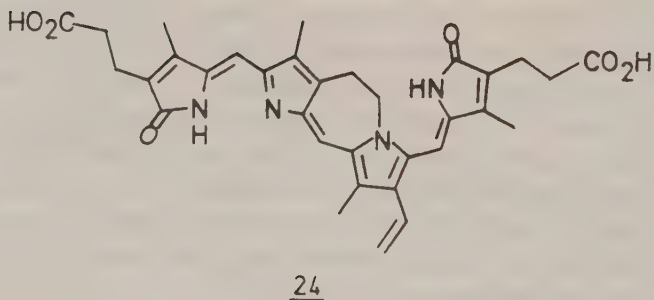
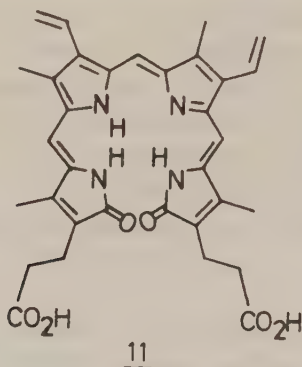
Hämoxygenasen spalten Häm und Hämoglobin (in-vitro auch andere Metalloporphyrine [109]) spezifisch an der α -Position, das entstehende BV hat also IX α -Struktur. Wird dagegen Häm chemisch durch gekoppelte Oxidation mit Ascorbat/Sauerstoff gespalten, so findet man die 4 Isomere BV IX α , IX β , IX γ und IX δ zu ungefähr gleichen Teilen [91]. Spaltet man Hämoglobin ebenfalls chemisch mit Ascorbat/Sauerstoff, dann isoliert man neben BV IX α (80-65 %) nur wenig BV IX β (20-35 %), nicht jedoch die beiden anderen Isomeren [110]. Das Vorkommen von BR IX β - neben BR IX α und verschiedenen Konjugaten - in der Gallenblase adulter Menschen, Rhesusaffen und Hunden ist vermutlich auch auf eine chemische Spaltung von Hämoglobin, z. B. mit Ascorbat/Sauerstoff, zurückzuführen [111]. Ob für die Bildung von BV IX δ und NBV IX δ eine Hämoxygenase existiert, die spezifisch an der δ -Brücke des Protoporphyrinrings spaltet, ist noch nicht bekannt.

Das Vorkommen von NBV IX δ zeigt eine Parallele zu den Schmetterlingsgallenfarbstoffen. Bis jetzt wurden 3 Strukturen aufgeklärt (Abb. 26), BV IX γ (11) (=Pterobilin) [13], NBV IX γ (24) (=Phorcabilin) [14] und 25 (=Sarpedobilin) [15]. Aufgrund ^{14}C -Markierungsexperimenten wird angenommen, daß 11 der Biosynthese-Vorläufer von 24 [112] und 25 [113] ist. Photochemisch [107] und thermisch [14] läßt sich BV IX γ zu NBV IX γ isomerisieren und dieses wiederum photochemisch [107] zu Sarpedobilin. BV IX δ , das wie BV IX γ eine Vinyl-Gruppe an C(8) besitzt, kann ebenso photochemisch [107] und thermisch [14] zu NBV IX δ isomerisiert werden. Durch photochemische Isomerisierung in Gegenwart von Sauerstoff werden weitere Isomere von BV IX δ erhalten [95], deren Strukturen teilweise aufgeklärt sind.

Während in Schmetterlingen ausschließlich IX γ -Gallenfarbstoffe vorkommen, existieren in den Ovarien von Turbo cornutus zwei Isomere, IX α (Turboverdin) und IX δ nebeneinander. Ob beide von der Schnecke selbst synthetisiert werden oder ob ein Farbstoff mit der Nahrung aufgenommen und eventuell nur noch modifiziert wird, ist noch nicht untersucht worden. Z. B. verwendet die Meeresschnecke Aplysia als Abwehrfarbstoff sog. Aplysiocyanin [9,10]. Dabei handelt es sich um den Monomethylester von PEB (Ester an der Propionsäure-Seitenkette von Ring B). Wie durch Fütterungsversuche gezeigt werden konnte, synthetisieren die

Schnecken den Chromophor nicht selbst, sondern verwenden als Quelle Phycoerythrin, das sie mit ihrer Algennahrung aufnehmen [114]. Möglicherweise trifft Ähnliches auf Turbo cornutus zu. Untersuchungen zur Biosynthese sind bisher noch nicht durchgeführt worden.

Abb. 26: Derivate des BV IX₈, isoliert aus Schmetterlingen

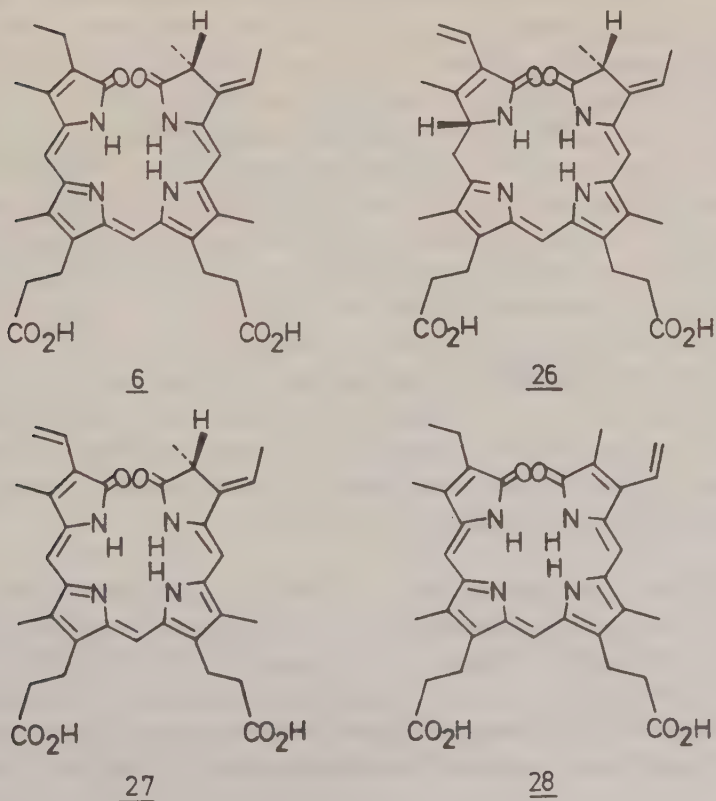


3.5 Chemische Totalsynthese von (Z,Z,Z)-(2RS,3SR)-8,12-bis-[2-(Methoxycarbonyl)-ethyl]-3-ethenyl-18-ethyl-1,2,3,19,22,24-hexahydro-2,7,13,17-tetramethyl-21H-bilin-1,19-dion (rac. 61)

3.5.1 Vorbemerkungen

Vergleicht man die Struktur des letzten bekannten Biosynthese-Zwischenprodukts BV IX α mit der des gebundenen PCB-Chromophors, so muß - ausgehend von BV IX α - eine Hydrierung der Vinyl-Gruppe an Ring D sowie an Ring A ebenfalls eine Hydrierung und die Addition des Apoproteins erfolgt sein. Da sowohl Phycoerythrobilin (26) (Abb. 27) als auch Phytochromobilin (27) (Abb. 27) an Ring D eine Vinyl-Gruppe wie BV IX α

Abb. 27: Strukturen von E-PCB (6 nicht verestert), E-PEB (26), E-Phytochromobilin (27), "Halb"-Mesobiliverdin (28)



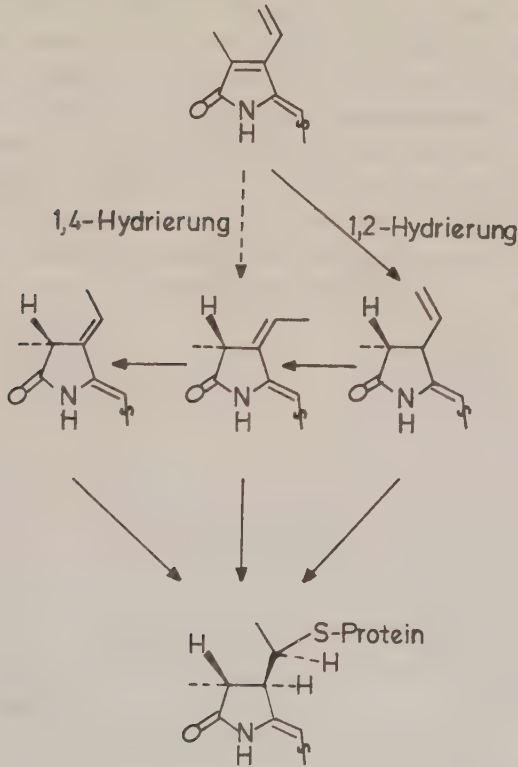
(9) besitzen, die Ringe A-B-C aber mit jenen des PCB identisch sind, kann vermutet werden, daß zuerst Ring A modifiziert und erst anschließend Ring D hydriert wird. In diesem Fall wäre Phytochromobilin ein Intermediat von PCB. Wird dagegen zuerst die Vinyl-Gruppe des D-Rings hydriert, müßte als Zwischenprodukt ein "Halb"-Mesobiliverdin 28 (Abb. 27) postuliert werden. Weder Phytochromobilin noch ein "Halb"-Mesobiliverdin ließ sich jedoch im Medienüberstand von Cyanidium caldarium nach Inkubation mit 5-ALA (5) nachweisen (vgl. 3.3.2). Dies kann vielleicht darauf zurückgeführt werden, daß die Modifizierungen an den Ringen A und D und die anschließende Bindung an das Apoprotein "in situ" von nur einem Enzym bzw. einem Enzymkomplex durchgeführt werden, so daß kein Zwischenprodukt freigesetzt wird.

Für die Hydrierung von Ring A und die Verknüpfung mit dem Apoprotein sind verschiedene Möglichkeiten denkbar. Da PCB im Medium von Cyanidium caldarium gefunden wird [70], kann angenommen werden, daß die Bindung des Apoproteins nicht an die Vinyl-Gruppe von BV IX α erfolgt, sondern daß zuerst hydriert wird. Eine Hydrierung der Vinyl-Gruppe zu einer Ethyl-Gruppe und eine anschließende Isomerisierung der Ring-Doppelbindung zu einer Ethylden-Doppelbindung kann wahrscheinlich ausgeschlossen werden, da MBV IX α (19) nicht in PC eingebaut worden ist (vgl. 3.3.3.6). Eine weitere Möglichkeit wäre eine 1,4-Hydrierung (Abb. 28), was direkt zu einem Chromophor mit einer Ethylden-Seitenkette - die Z-konfiguriert sein müßte (vgl. 3.3.3.6) - führen würde. Für wahrscheinlicher wird aber eine Hydrierung von Ring A zu einem 2,3-Dihydro-Gallenfarbstoff gehalten (Abb. 28). Das Apoprotein könnte dann direkt an die noch vorhandene Vinyl-Gruppe an C(3) addiert werden oder aber erst nach Umlagerung der Vinyl-Gruppe in eine Ethylden-Gruppe an diese, was das Vorliegen von PCB im Medium von Cyanidium caldarium nach 5-ALA-Inkubation erklären würde.

Um die Existenz eines solchen 2,3-Dihydro-Vinyl-Gallenfarbstoffs im Biosyntheseweg zu untersuchen, sollte Cyanidium caldarium mit diesem Chromophor inkubiert werden. Da der Farbstoff in der Literatur noch nicht beschrieben war, mußte zunächst eine chemische Synthese entwickelt werden. Diese Synthese sollte eine Markierung mit ^{14}C erlauben. Für Ring D kam eine Vinyl- oder Ethyl-Gruppe in Frage; da Ethyl-

Gruppen stabiler und einfacher zu synthetisieren sind, wurde diese bevorzugt.

Abb. 28: Hypothetische Biosynthese-Wege: Aufgrund der besseren Übersicht wurde die Hydrierung der Vinyl-Gruppe an Ring D nicht in das Schema miteinbezogen.

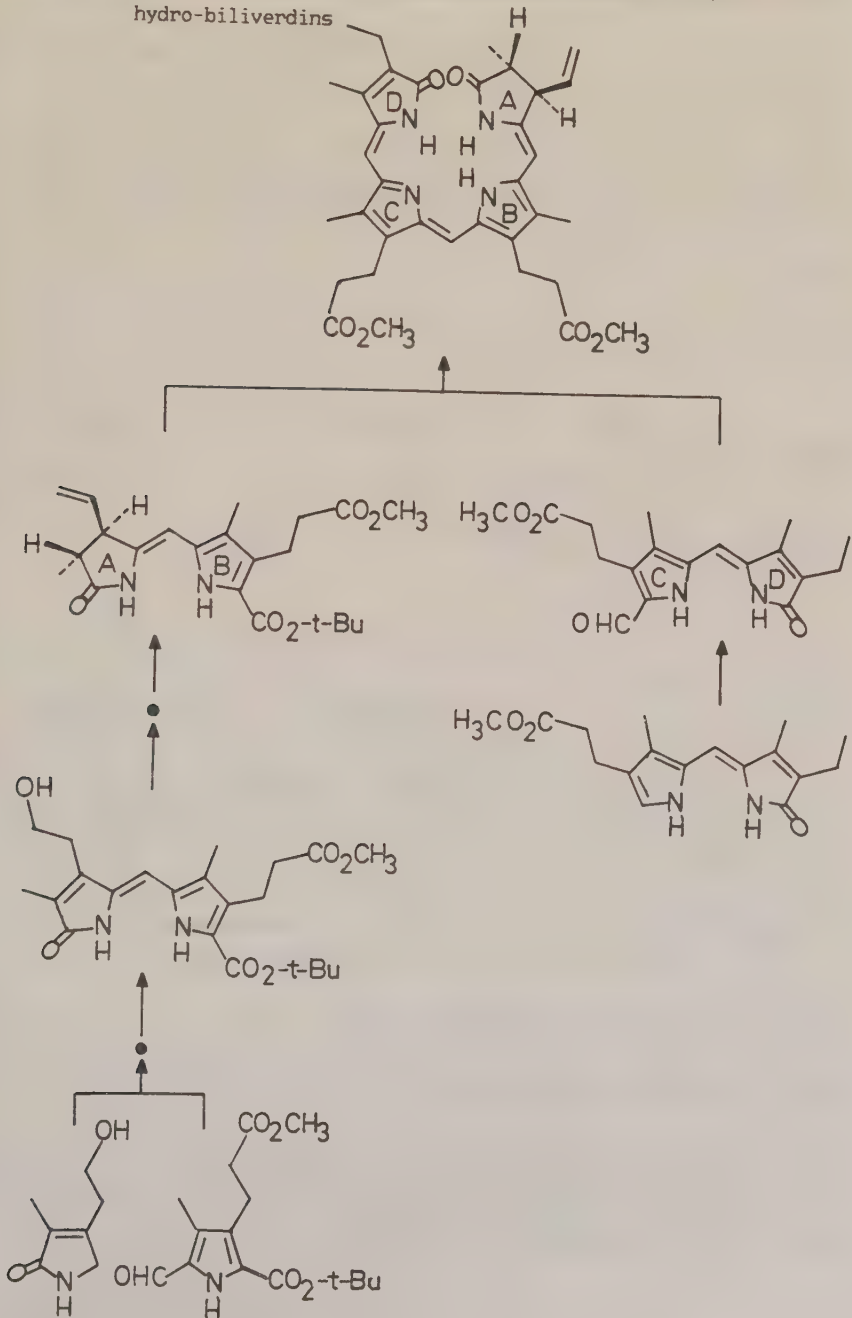


3.5.2 Synthese-Konzept

In Abb. 29 ist das geplante Synthese-Schema dargestellt. Der Gallenfarbstoff sollte durch Kondensation eines trans-Dihydro-dipyrinons

(Ringe A-B) mit einem formylierten Dipyrrinon (Ringe C-D) dargestellt werden. Das formylierte Dipyrrinon war aus dem α -freien Dipyrrinon durch Formylierung mit Orthoameisensäure-triethylester/TFA zugänglich. Im Falle einer ^{14}C -Markierung könnte an dieser vorletzten Stufe die Markierung eingebaut werden. Während die Synthese der Ringe C-D bereits bekannt war [35], mußte ein Weg zur Darstellung des trans-2,3-Dihydro-dipyrrinons gefunden werden. Die Vinyl-Gruppe sollte analog der PEB-Synthese [37] aus einer Hydroxyethyl-Gruppe synthetisiert werden, die zum Selenid umgesetzt wird, welches dann durch Oxidation mit Wasserstoffperoxid zum Olefin führt. Das trans-2,3-Dihydro-Gerüst sollte aus einem Dipyrrinon durch Hydrierung und anschließende Isomerisierung gebildet werden. Dabei war ein Racemat zu erwarten, das aber vorerst nicht getrennt werden sollte. Für die Darstellung des Dipyrrinons war das bereits bekannte 2-Formyl-4-[2-methoxycarbonyl)-ethyl]-3-methyl-1H-pyrrol-5-carbonsäure-tert.-butylester sowie das noch nicht beschriebene 4-(2-Hydroxyethyl)-3-methyl-3-pyrrolin-2-on zu synthetisieren.

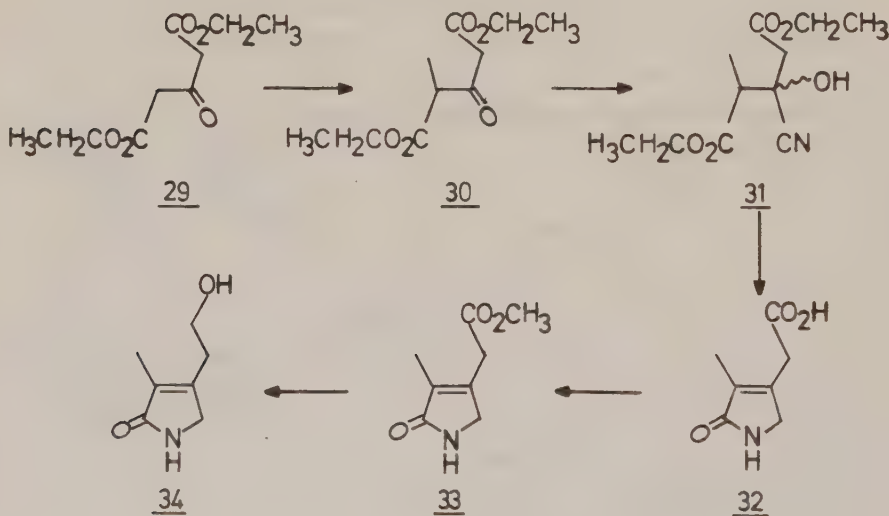
Abb. 29: Synthese-Schema für die Darstellung eines 2,3,18¹,18²-Tetrahydro-biliverdins



3.5.3 Darstellung von Pyrrolinon 34

Die Synthese des Hydroxyethyl-Pyrrolinons 34 erfolgte wie in der Literatur [117] beschrieben aus einem Carboxymethyl-Pyrrolinon. Durch Methylierung von 3-Ketoglutaräure-diethylester (29) erhielt man Verbindung 30, die zum Cyanhydrin 31 umgesetzt wurde. Dieses wurde an Raney-Nickel hydriert und ergab nach Hydrolyse Pyrrolinon 32. Veresterung und anschließende Reduktion führte über Pyrrolinon 33 zu 34 (Abb. 30).

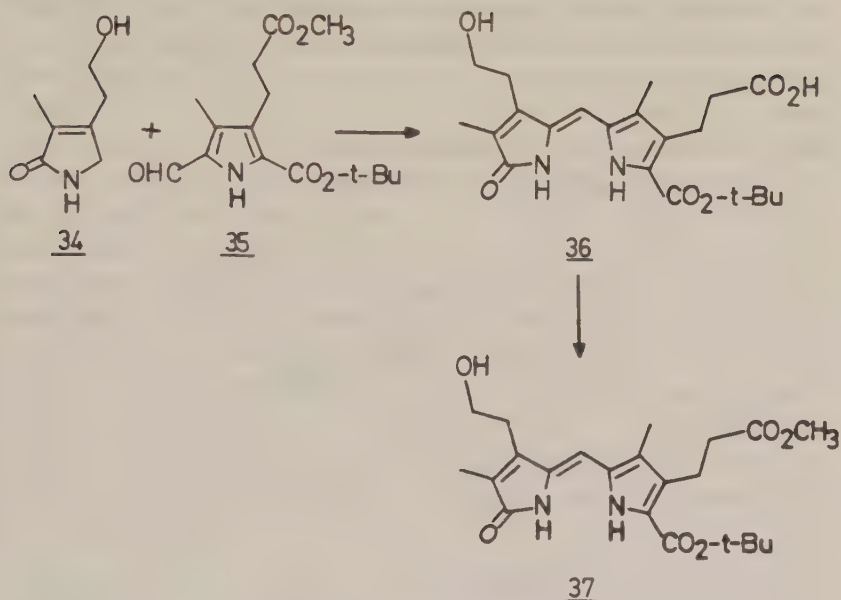
Abb. 30: Darstellung von Pyrrolinon 34



3.5.4 Darstellung von Dipyrinon rac. 49

3.5.4.1 Kondensation und Veresterung

Durch Kondensation von Pyrrolinon 34 mit Pyrrol 35 [118-123] in wäßriger Kalilauge erhielt man Dipyrinon 36, das mit Methanol in Gegenwart von DCC [124] zu 37 verestert wurde (Abb. 31).

Abb. 31: Darstellung von Dipyrinon 37

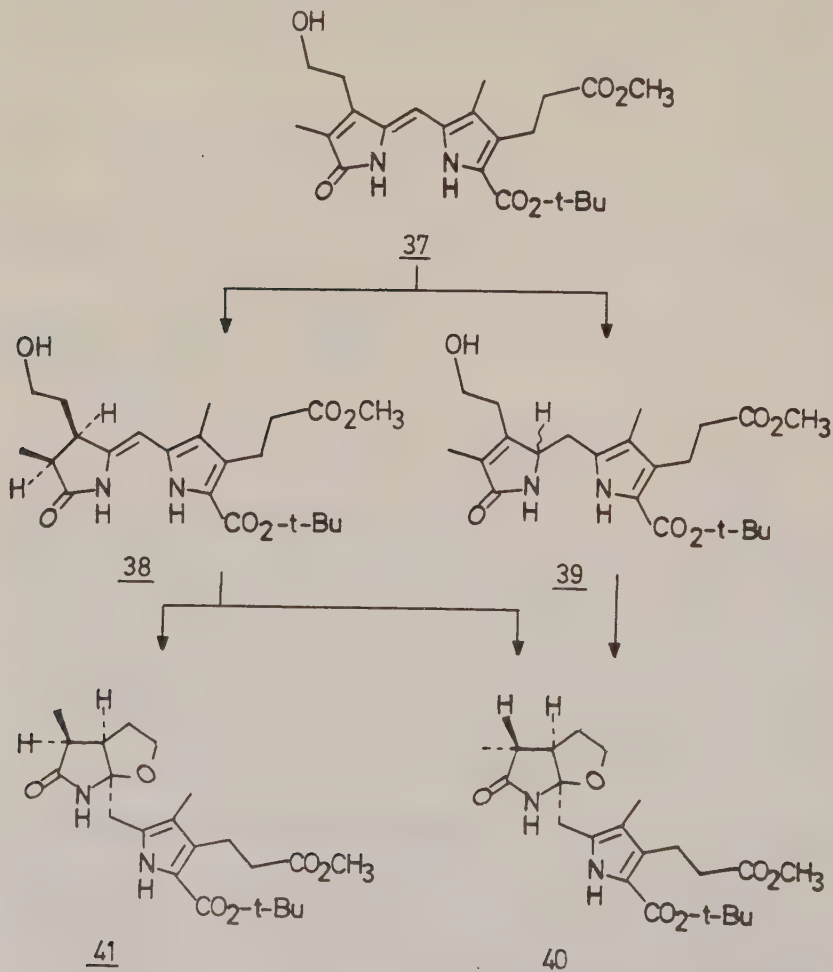
3.5.4.2 Hydrierung und Isomerisierungsversuche

Durch Hydrierung von Dipyrinonen an Palladium/Kohle in Methanol/KOH erhält man zu ca. 80 % die 4,5-Dihydro-Verbindungen, in Methanol ohne Base dagegen zu ungefähr gleichen Teilen die 4,5-Dihydro- sowie die cis-2,3-Dihydro-dipyrinone [115]. Hydrierung an Palladium auf Strontiumcarbonat soll dagegen zu 70 % die cis-2,3-Dihydro-Derivate liefern [116]. Cis-2,3-Dihydro-Verbindungen lassen sich quantitativ, die 4,5-Dihydro-Verbindungen in 30-40 %iger Ausbeute mit 2 N Natriummethanolat zu trans-2,3-Dihydro-dipyrinonen isomerisieren [115,116].

Hydrierung von Dipyrinon 37 in Benzol/Methanol an Palladium/Calciumcarbonat ergab das cis-2,3-Dihydro-dipyrinon rac. 38 (52 %) und das 4,5-Dihydro-dipyrinon 39 (26 %) (Abb. 32). Die Isomerisierungsversuche von Verbindung rac. 38 bzw. 39 mit Base führten jedoch nicht zur trans-2,3-Dihydro-Verbindung. Neben Edukt wurde im Falle des 4,5-Dihydro-dipyrinons Verbindung rac. 40 isoliert, das cis-2,3-Dihydro-dipyrinon wurde quantitativ zu einem Gemisch der beiden

Diastereomeren rac. 40 und rac. 41 umgesetzt. Verbindung rac. 41 ließ sich aus rac. 38 auch quantitativ mit saurem Chloroform darstellen (vgl. [125]), so daß die spektroskopischen Daten ohne Isomerentrennung erhalten werden konnten.

Abb. 32: Hydrierung und Isomerisierungsversuche



Die Struktur von rac. 40 und rac. 41 ergab sich aus den spektroskopischen Daten. Das UV/VIS-Spektrum zeigte wie bei Pyrrolen oder 4,5-

Dihydro-dipyrrinonen ein Maximum bei 280 nm, während 2,3-Dihydro-dipyrrinone ca. 30 nm langwelliger absorbieren. Bei der Massenspektroskopie war der M^+ -Peak bei $m/e=420$, entsprach also dem der Edukte. Im 1H -NMR-Spektrum (Abb. 33 und 34) waren - verglichen mit den beiden Edukten - alle Signale für Ring B vorhanden, auffallend waren aber starke Veränderungen der Kopplungsmuster der Hydroxyethyl-Gruppe sowie ein AB-System bei ca. 3.0 ppm, das einer CH_2 -Brücke zwischen Ring A und B zugeordnet werden konnte. Die Methyl-Gruppe $H_3C(2^1)$ zeigte Kopplung mit einem Proton an C(2), dieses wiederum noch Kopplung mit einem Proton an C(3). Aufgrund dieser Daten konnte eine 2,5-Dihydro-Verbindung mit einer Hydroxyethyl-Seitenkette ausgeschlossen werden. Alle spektroskopischen Eigenschaften ließen sich aber mit einem Ringschluß zwischen der Hydroxy-Gruppe und C(4) des Dipyrrinons erklären. Im Einklang mit dieser Struktur standen auch die ^{13}C -NMR-Daten. Mit Hilfe von NOE-Experimenten ließ sich die Stellung der Protonen an C(2) und C(3) ermitteln, Verbindung rac. 40 besitzt trans-, Verbindung rac. 41 cis-Konfiguration.

Abb. 33: ^1H -NMR-Spektrum von rac. 40 (CDCl_3 , 360 MHz)

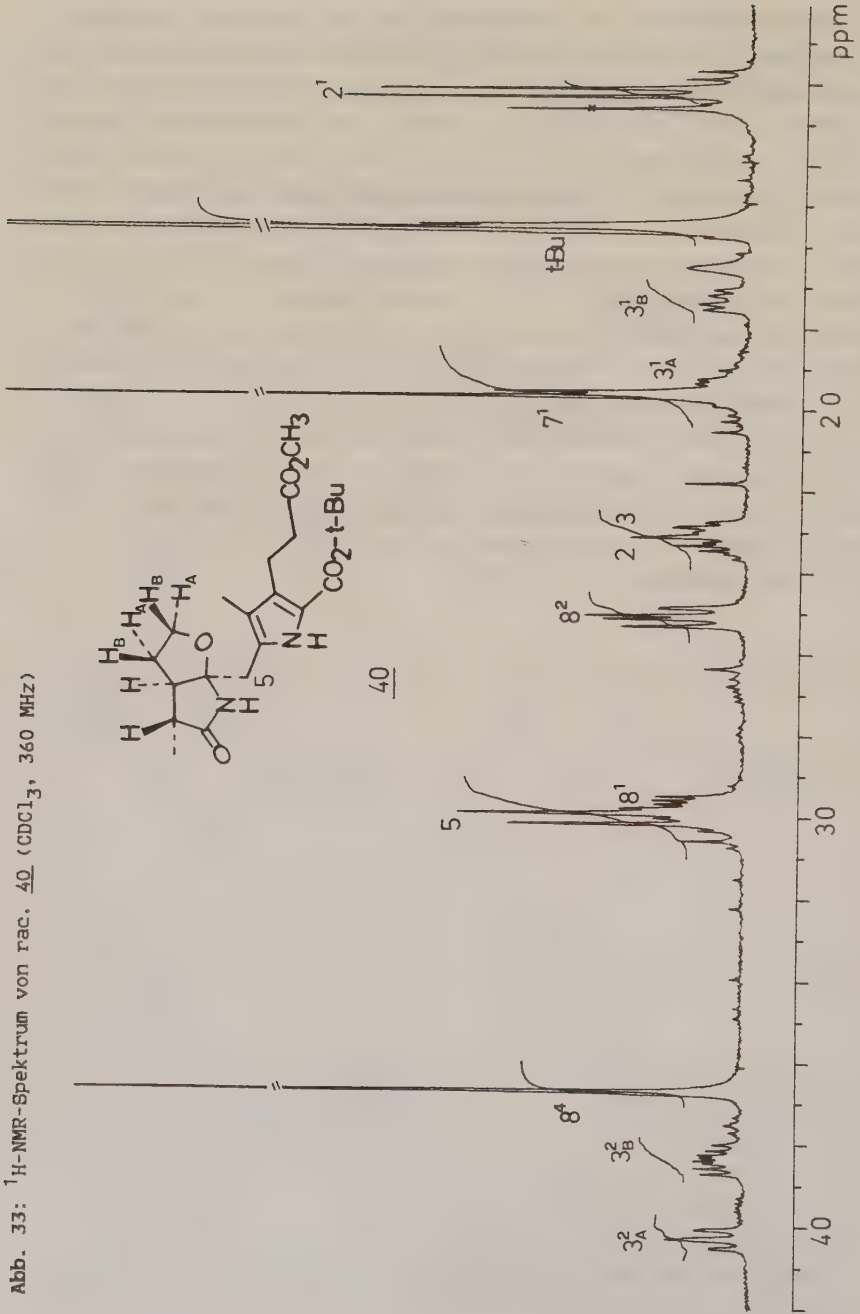
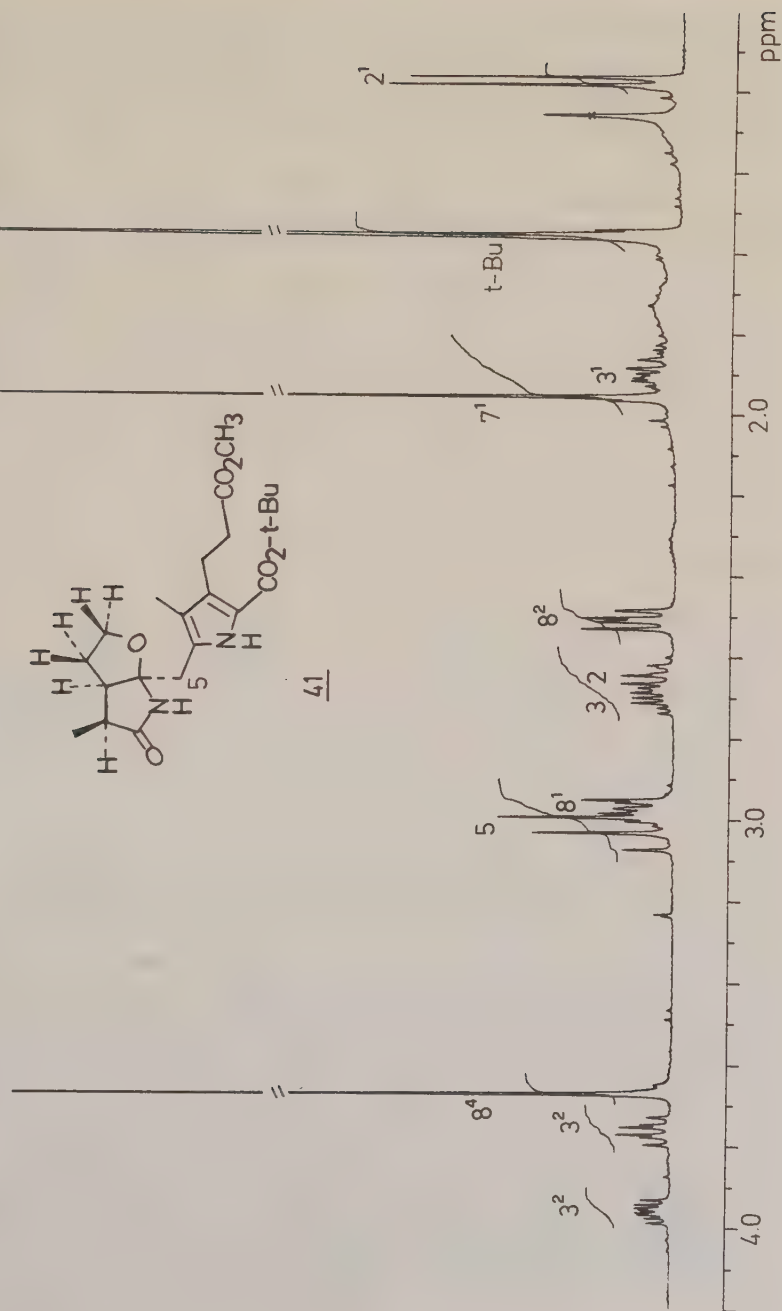
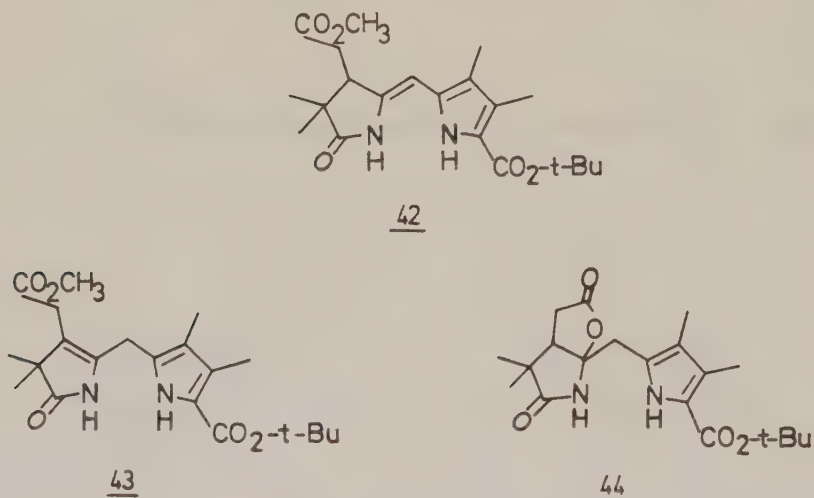


Abb. 34: ^1H -NMR-Spektrum von rac. 41 (CDCl_3 , 360 MHz)

Ein ähnlicher Ringschluß wird für das 2,3-Dihydro-dipyrinon 42 mit einer Essigsäure-methylester-Seitenkette an C(3) beschrieben [125]. Bei Behandlung mit Säure isolierte man neben Edukt 42 und der 2,5-Dihydro-Verbindung 43 auch das Lacton 44 (Abb. 35).

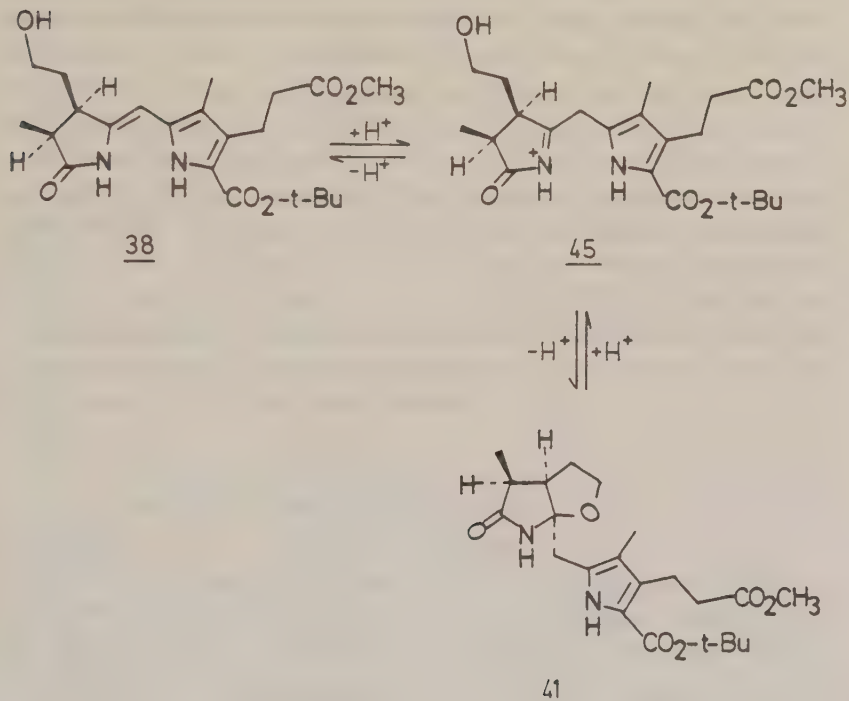
Abb. 35: Wurde 42 mit Säure behandelt [125], so isolierte man neben Edukt auch die beiden Verbindungen 43 und 44.



Die Isomerisierung von Dipyrinon rac. 38 mit saurem Chloroform erfolgt vermutlich nach folgendem Mechanismus (Abb. 36): Protonierung an C(5) führt zur Bildung des Iminium-Kations rac. 45. Durch Addition der Hydroxy-Gruppe an C(4) und Abspaltung eines Protons erhält man Produkt rac. 41. Erster Schritt bei der basischen Isomerisierung von Dipyrinon rac. 38 und 39 ist eine Deprotonierung, wobei aufgrund ähnlicher pK_S -Werte mehrere Positionen in Frage kommen: Bei beiden Verbindungen das Stickstoff-Proton HN(10) und das Sauerstoff-Proton der Hydroxyethyl-Gruppe, bei Dipyrinon rac. 38 HC(2) und bei Dipyrinon 39 HC(4). Wie der Mechanismus im jeweiligen Fall aussieht oder ob zum Teil mehrere nebeneinander ablaufen, wurde nicht untersucht. Es wird aber angenommen, daß ähnliche Mechanismen auftreten wie bei der in der Literatur [115] beschriebenen Isomerisierung eines cis-2,3-Dihydro-

bzw. 4,5-Dihydro-dipyrinons zur trans-2,3-Dihydro-Verbindung.

Abb. 36: Mechanismus der Isomerisierung von rac. 38 mit saurem Chloroform zu rac. 41



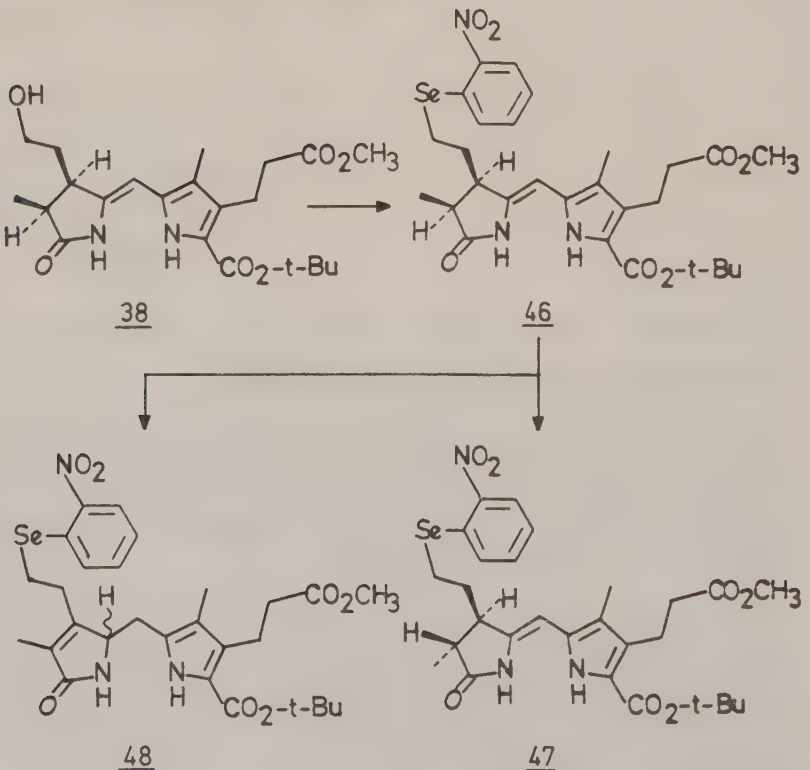
3.5.4.3 Umsetzung zum Selenid und Isomerisierung

Da auf der Stufe der Hydroxyethyl-Dihydro-dipyrinone rac. 38 und 39 eine Isomerisierung zum gewünschten trans-2,3-Dihydro-dipyrinon nicht möglich war, wurde zuerst das Selenid rac. 46 dargestellt und dann auf dieser Stufe die Isomerisierung versucht.

Die Umsetzung erfolgte zunächst nur mit rac. 38, was zum cis-2,3-Dihydro-dipyrinon rac. 46 führte (Abb. 37). Bei einem Isomerisierungsversuch wurde jedoch neben Zersetzungsprodukten nur das Edukt isoliert. Zufällig wurde aber dann eine cis-trans-Isomerisierung im NMR-Röhrchen in Chloroform beobachtet. Das Chloroform war nicht über

Aluminiumoxid filtriert worden und enthielt daher Salzsäure und Spuren von Wasser. Nach 3 h waren ca. 50 % isomerisiert, nach 5-6 h war zu 100 % die trans-Verbindung enthalten. Der Nachweis der trans-Konfiguration bei rac. 47 bzw. der cis-Konfiguration bei rac. 46 erfolgte durch NOE-Untersuchungen. Die ^1H -NMR-Spektren der beiden Verbindungen unterscheiden sich nur sehr wenig. Während das Methin-Proton HC(5) ($\Delta=0.1$ ppm) und die beiden Ring-Protonen HC(2) ($\Delta=0.42$ ppm) und HC(3) ($\Delta=0.32$ ppm) bei der Isomerisierung von cis nach trans zu höherem Feld verschoben werden, shiften die Methyl-Gruppe $\text{H}_3\text{C}(2^1)$ ($\Delta=0.06$ ppm) sowie die Methylen-Protonen $\text{H}_2\text{C}(3^1)$ ($\Delta 0.1$ ppm) leicht zu tieferem Feld. Die cis-Kopplung $J(2,3)$ beträgt 8.2 Hz, die trans-Kopplung $J(2,3)$ nur 5.0 Hz.

Abb. 37: Darstellung des Selenid-dipyrrinons rac. 46 und Isomerisierung zu rac. 47 und 48

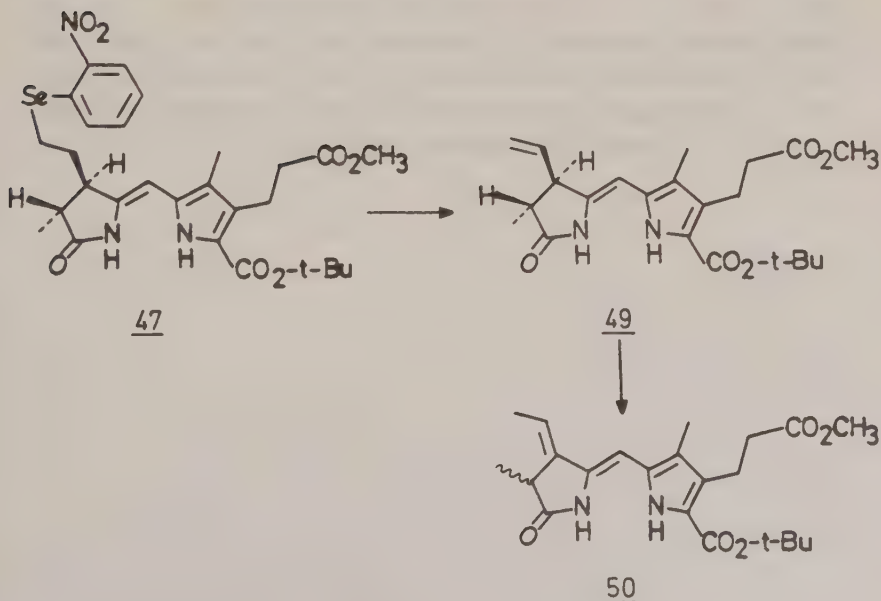


Probleme ergaben sich bei der Reproduktion der Isomerisierung. Wie in der Literatur für 2,3-Dihydro-dipyrrinone beschrieben [116], erfolgte in saurem Chloroform auch eine Isomerisierung zur 4,5-Dihydro-Verbindung 48 (Abb. 37). Definierte Bedingungen für eine 100 %ige Isomerisierung von cis nach trans ließen sich nicht finden, am besten gelang die Umsetzung mit Chloroform, das mit 4 N Salzsäure geschüttelt worden war.

3.5.4.4 Oxidation zur Vinylgruppe

Selenid rac. 47 wurde mit Wasserstoffperoxid in THF zur Vinyl-Verbindung rac. 49 umgesetzt (Abb. 38). Bei der NMR-spektroskopischen Untersuchung von rac. 49 wurde aber in Chloroform eine Isomerisierung der Vinyl- in eine Ethyliden-Gruppe beobachtet (Abb. 38). NOE-Untersuchungen zeigten, daß die entstandene Ethyliden-Doppelbindung von Verbindung 50 E-Konfiguration aufwies.

Abb. 38: Oxidation zum Vinyl-dipyrripon rac. 49 und beobachtete Umlagerung zum Ethyliden-dipyrripon 50



Aufgrund der beobachteten Umlagerung bei der cis/trans-Isomerisierung zum 4,5-Dihydro-dipyrinon 48 sowie der Vinyl-Verbindung rac. 49 zur Ethyliden-Verbindung 50 unter sauren Bedingungen waren Schwierigkeiten bei der Abspaltung der Schutzgruppe an C(9), des tert.-Butylesters, zu erwarten. Üblicherweise erfolgt die Hydrolyse mit TFA, 15 Minuten bei RT, wobei gleichzeitig zum α -freien Dipyrinon decarboxyliert wird, das dann entweder formyliert oder mit einem formylierten Dipyrinon zum Gallenfarbstoff kondensiert wird. Für die Kondensation waren dann in der Literatur [116] wieder Bedingungen beschrieben, unter denen 2,3-Dihydro-dipyrinone nicht umlagern.

In einem Vorversuch konnte nach Behandlung von Verbindung rac. 49 mit TFA und Aufarbeitung kein Produkt isoliert werden, das Dipyrinon war zersetzt. Versuche, die Schutzgruppe mit Trimethylsilyl-Iodid abzuspalten, hatten neben der Hydrolyse und Decarboxylierung stets eine Isomerisierung der 2,3-Dihydro-Verbindung zur 4,5-Dihydro-Verbindung zur Folge. Deshalb sollte Dipyrinon 37 in die α -freie Verbindung überführt und diese dann zur Verbindung 51 (Abb. 39) formyliert werden, da α -freie Dipyrinone nicht sehr stabil sind. Nachteil dieser Reaktionsfolge war, daß auch die Aldehyde weniger stabil sind als Dipyrinone mit einer tert.-Butylester-Gruppe an C(9) und - falls der Vinyl-Gallenfarbstoff ausreichend stabil sein sollte für eine Inkubation mit Cyanidium caldarium - eine radioaktive Markierung schon auf einer relativ frühen Stufe eingeführt werden mußte.

3.5.5 Formylierung und Kondensation zum Selenid-Gallenfarbstoff rac. 59

Bei der Formylierung von Dipyrrrinon 37 in TFA mit Orthoameisensäure-triethylester wurden neben dem gewünschten Dipyrrrinon 51 noch andere Verbindungen erhalten. Ein Nebenprodukt wurde als Verbindung 52 identifiziert. Es handelt sich um ein Dipyrrrinon, bei dem außer der C(9)-Position auch die Hydroxy-Gruppe der C(3)-Seitenkette formyliert worden ist (Abb. 39).

Verbindung 51 wurde zum cis-2,3-Dihydro-dipyrrrinon rac. 53 hydriert (Abb. 39). Auf dieser Stufe wurde nun versucht, die Kondensation zum Gallenfarbstoff durchzuführen. Es wurde aber wiederum der Ringschluß zwischen der Hydroxy-Gruppe und C(4) beobachtet. Deshalb setzte man Produkt rac. 53 zum cis-2,3-Dihydro-selenid-dipyrrrinon rac. 54 um, das dann mit Dipyrrrinon 58 zum Selenid-Gallenfarbstoff 59 (Abb. 39) kondensiert wurde. Die Umsetzung erfolgte in Chloroform mit dem Kondensationsreagenz Phosphorylbromid + 2,6-Di-tert.-butyl-4-methyl-pyridin [116]. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von rac. 59 ist in Abb. 40 dargestellt.

Versuche, den cis-Dihydro-Gallenfarbstoff mit saurem Chloroform zum trans-Dihydro-Gallenfarbstoff zu isomerisieren, lieferte in zwei Ansätzen ausschließlich die 4,5-Dihydro-Verbindung 60 ($^1\text{H-NMR}$ in Abb. 41). Deshalb wurde auf eine Isomerisierung verzichtet.

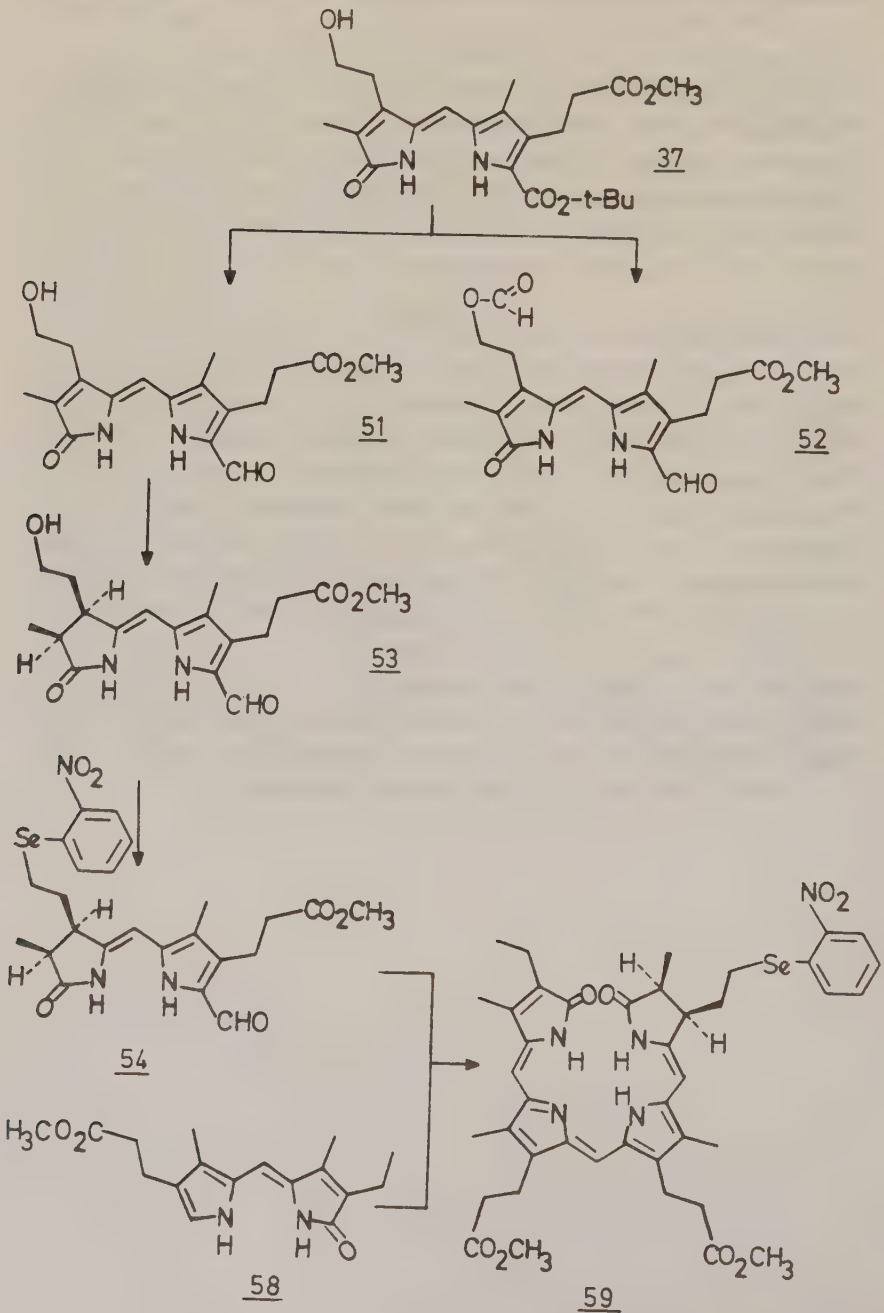
Abb. 39: Darstellung des cis-Dihydro-Selenid-Gallenfarbstoffs rac. 59

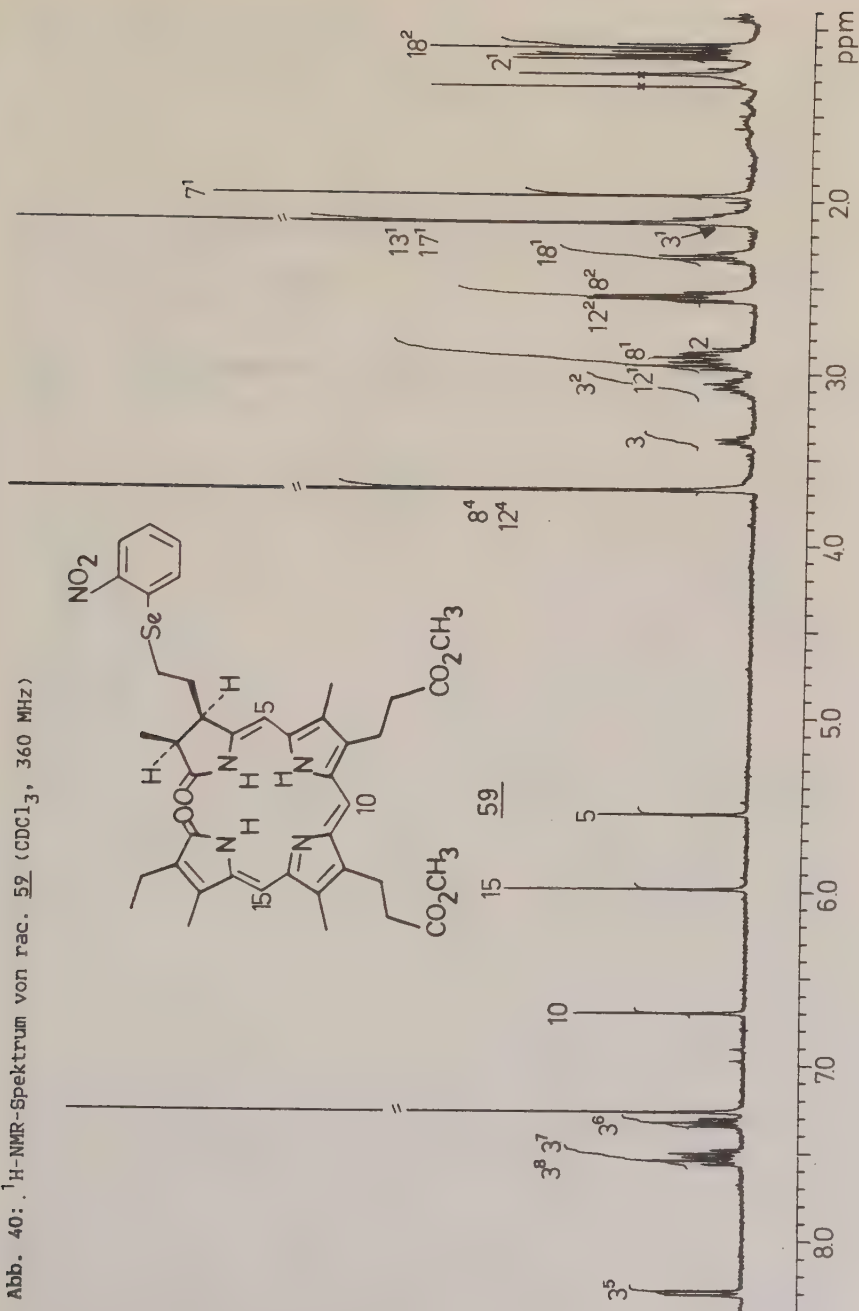
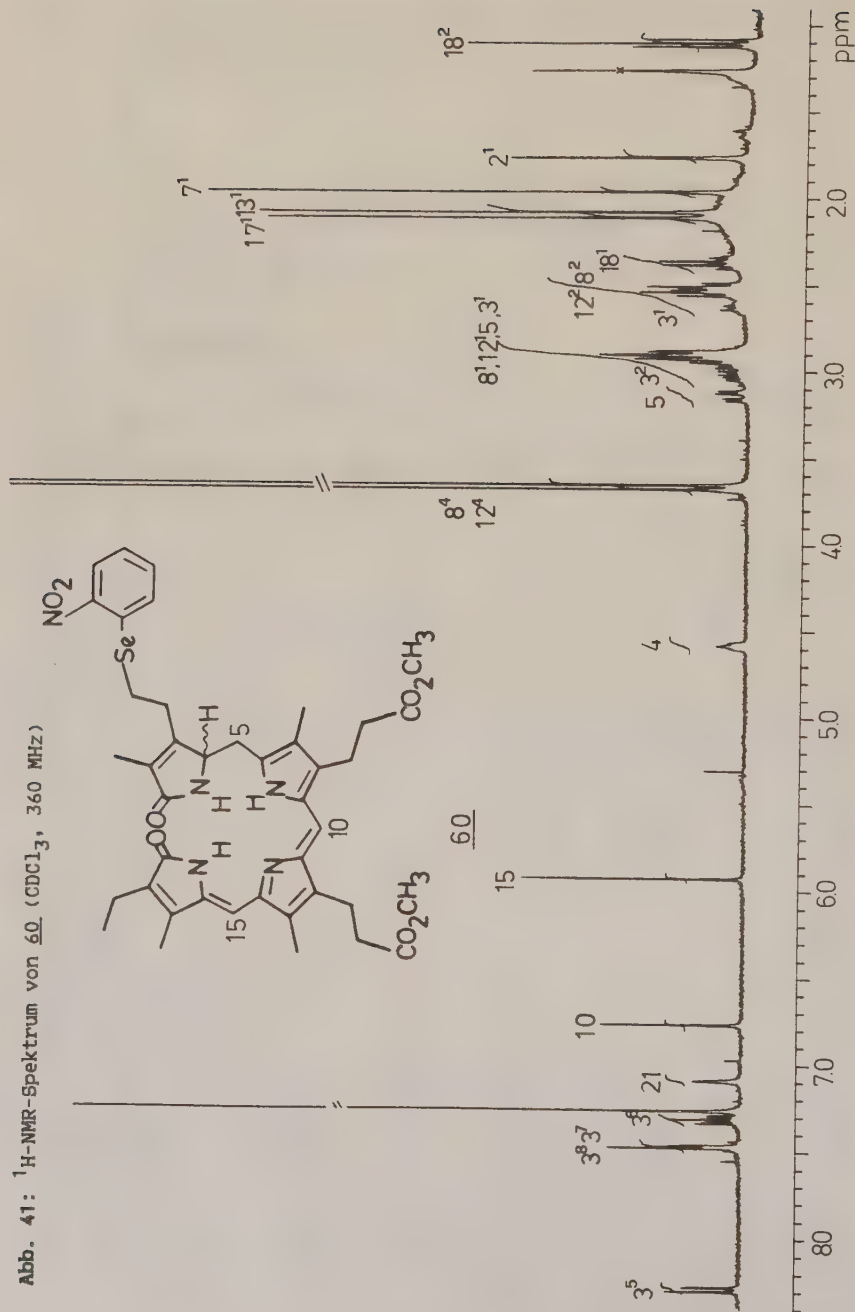
Abb. 40: ^1H -NMR-Spektrum von rac. 52 (CDCl_3 , 360 MHz)

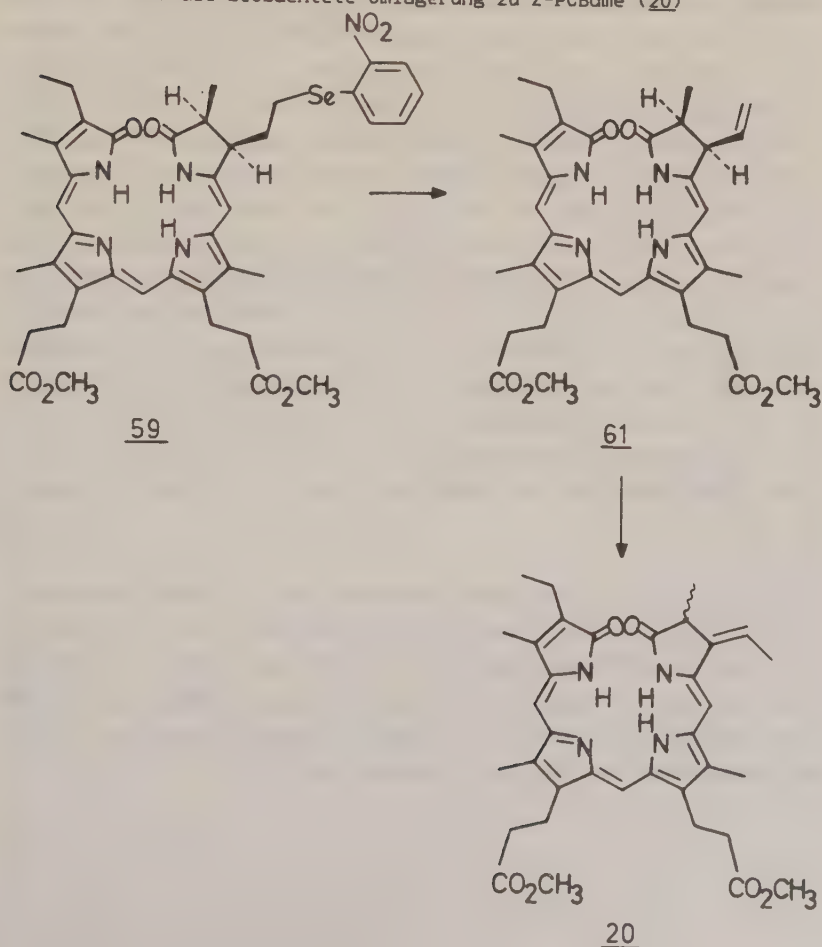
Abb. 41: ^1H -NMR-Spektrum von 60 (CDCl_3 , 360 MHz)



3.5.6 Oxidation zur Vinyl-Gruppe

Die Oxidation des Selenid-Gallenfarbstoffs rac. 59 erfolgte mit Wasserstoffperoxid in THF. Der Reaktionsverlauf wurde durch ADC verfolgt. Nach 2 h war das Edukt vollständig zu einem blauen Produkt umgesetzt, das schneller als rac. 59 wanderte. Das ^1H -NMR-Spektrum dieses Produkts zeigte jedoch, daß es sich um Z-PCBdme (20) handelte. Die gebildete Vinyl-Gruppe war also bereits zur Ethyliden-Gruppe umgelagert (Abb. 42).

Abb. 42: Darstellung des cis-Dihydro-Vinyl-Gallenfarbstoffs rac. 61 und die beobachtete Umlagerung zu Z-PCBdme (20)



Die beobachtete Umlagerung konnte bereits im Reaktionsansatz, bei der Aufarbeitung mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung/Methylenchlorid, bei der DC oder erst bei der NMR-Messung erfolgt sein.

Die Reaktion wurde deshalb wiederholt und neben der ADC-Kontrolle UV/VIS-Messungen durchgeführt. Das UV/VIS-Spektrum des Vinyl-Gallenfarbstoffs rac. 61 sollte sich - abgesehen von den Absorptionen, die auf die Selenid-Gruppe zurückzuführen sind - nicht vom Edukt rac. 59 unterscheiden (λ_{max} : 348 und 590 nm), während das von Z-PCBdme (20) aufgrund der Konjugation der Ethyilden-Doppelbindung mit dem Bilin-Chromophor verschieden ist (λ_{max} : 364 und 600 nm). Es zeigte sich, daß zunächst das UV/VIS-Spektrum noch dem Edukt rac. 59 entsprach, während auf der ADC-Platte neben Edukt bereits Z-PCBdme identifiziert werden konnte. Eluieren des Produkts und Aufnahme eines UV/VIS-Spektrums bewiesen die Zuordnung als Z-PCBdme. Das hieß also, daß die Umlagerung spätestens bei der DC erfolgte. Durch weitere Messungen ließ sich dann aber auch im Reaktionsansatz Z-PCBdme UV/VIS-spektroskopisch nachweisen. Neben einer Bande bei 348 nm trat eine weitere bei 364 nm auf, die immer mehr an Intensität gewann. Schließlich war DC-mäßig nur noch Z-PCBdme nachweisbar, das UV/VIS-Spektrum zeigte aber immer noch zwei Absorptionen bei 348 nm und 364 nm in einem Verhältnis von ungefähr 1:1. Nun wurde aufgearbeitet und noch einmal ein UV/VIS-Spektrum aufgenommen. Es war unverändert. Ohne Reinigung durch DC wurde dann ein ^1H -NMR-Spektrum aufgenommen (Abb. 43). Es zeigte ein Gemisch von zwei Verbindungen, Z-PCBdme (20) und Vinyl-Gallenfarbstoff rac. 61. Durch Entkopplungen und NOE-Experimente konnten alle Signale zugeordnet werden.

Versuche, den cis-Dihydro-Vinyl-Chromophor rac. 61 durch Chromatographie auf basischem Aluminiumoxid rein zu erhalten, schlugen fehl. Es fand immer eine Umlagerung statt. Durch Subtraktion des ^1H -NMR-Spektrums von reinem Z-PCBdme (20) (Abb. 44) vom ^1H -NMR-Spektrum des Reaktionsansatzes konnte ein ^1H -NMR-Differenz-Spektrum des Vinyl-Gallenfarbstoffs rac. 61 erhalten werden (Abb. 45).

Abb. 43: ^1H -NMR-Spektrum von rac. 61 + 20 (CDCl_3 , 360 MHz)

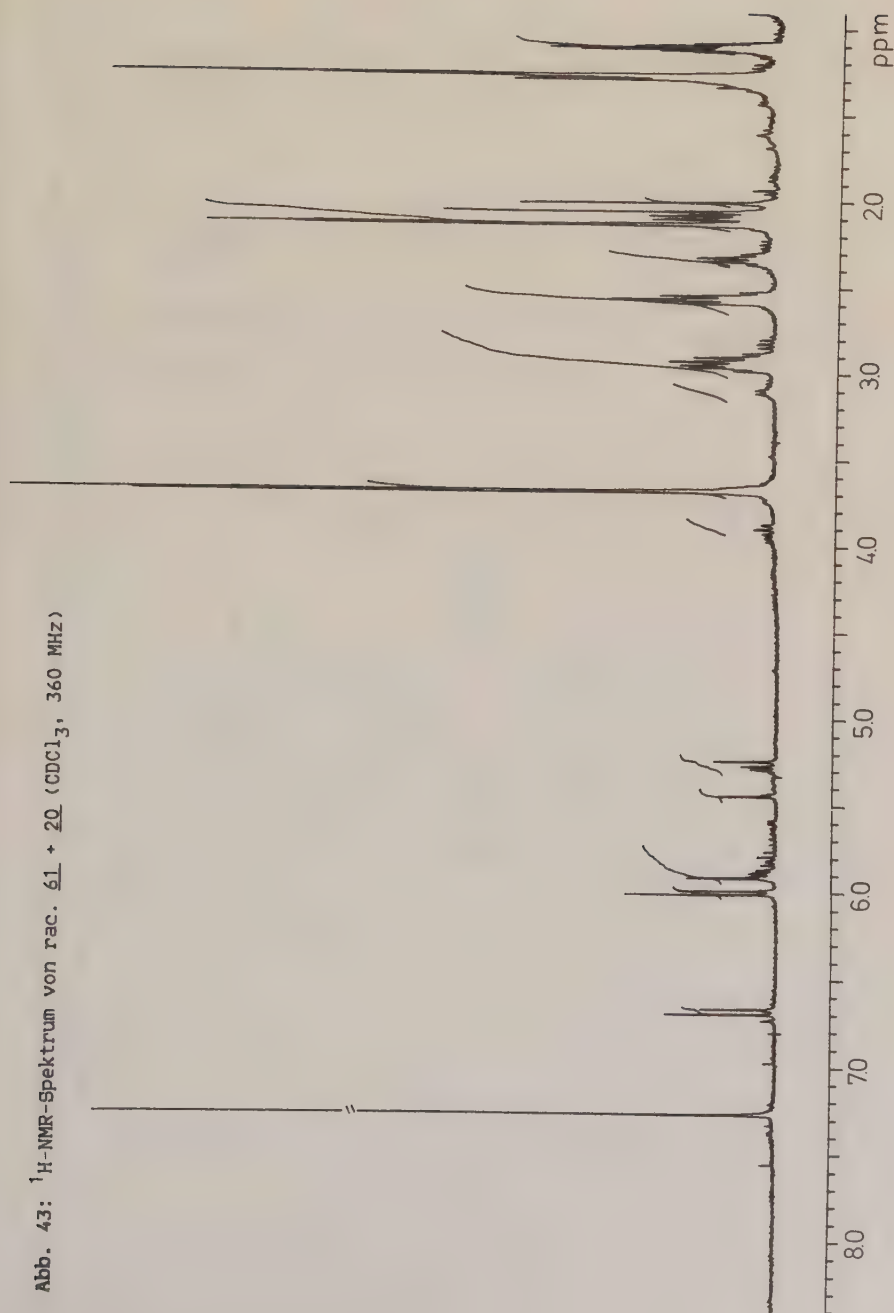


Abb. 44: ^1H -NMR-Spektrum von Z-PCBdme (CDCl_3 , 360 MHz)

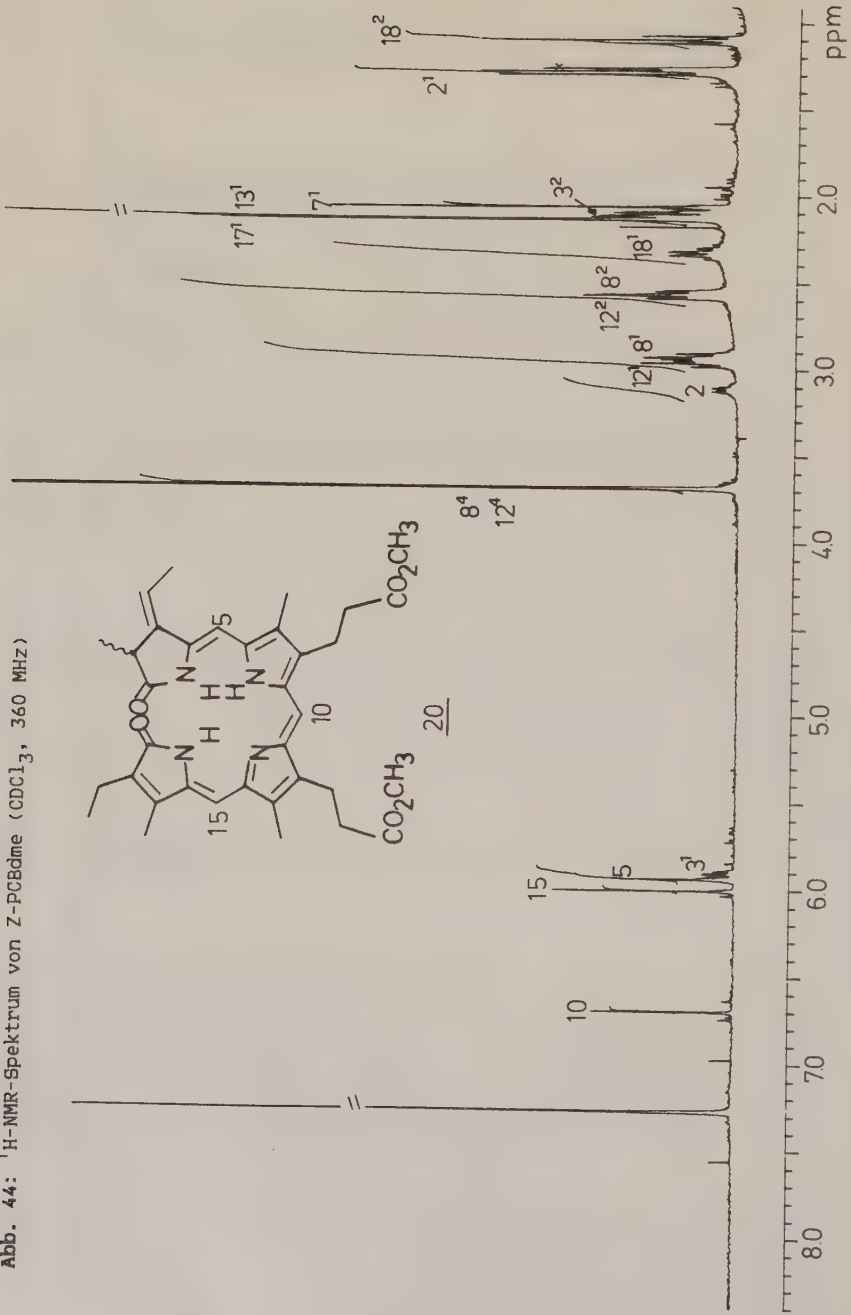
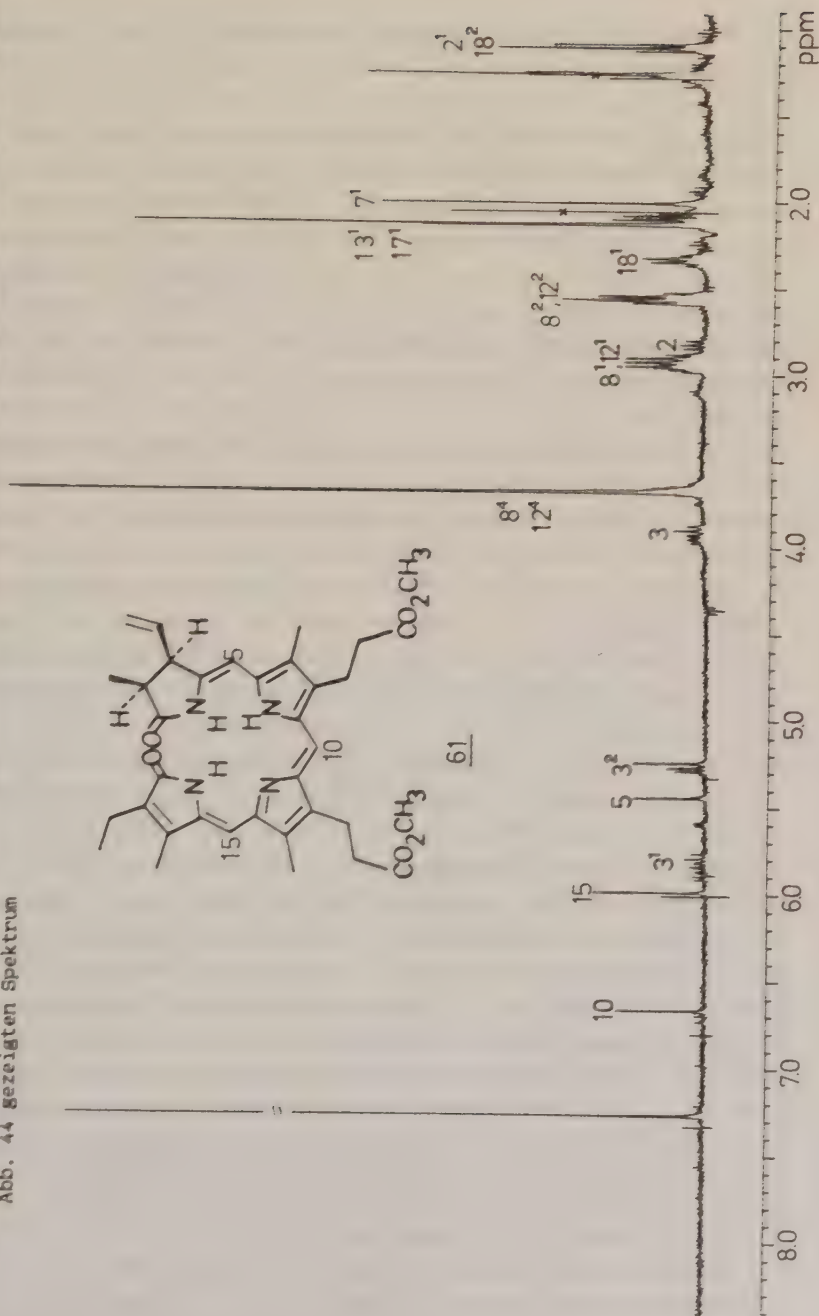


Abb. 45: ^1H -NMR-Differenz-Spektrum von rac. 6L, erhalten durch Subtraktion des Spektrums von Abb. 43 von dem in Abb. 44 gezeigten Spektrum



3.5.7 Diskussion der Umlagerung der Vinyl-Gruppe in eine Ethyliden-Gruppe

Während die Vinyl-Gruppe des Gallenfarbstoffs rac. 61 sehr leicht in eine Z-konfigurierte Ethyliden-Gruppe umgelagert wurde, lagerte sich die Vinyl-Gruppe des Dipyrrinons rac. 49 erst mit Säure in eine E-konfigurierte Ethyliden-Gruppe um. Die unterschiedliche Geschwindigkeit der Umlagerung war vermutlich auf das unterschiedliche Gerüst, nämlich ein Tetrapyrrol bzw. ein Dipyrrol zurückzuführen. Der Konfigurationsunterschied der Ethyliden-Gruppe konnte dagegen aus der cis- bzw. trans-Stellung der beiden Protonen HC(2) und HC(3) resultieren.

Da die Synthese eines trans-Dihydro-Gallenfarbstoffs nicht gelungen war, wurde das cis-Vinyl-dipyrrinon rac. 62 aus dem entsprechenden Selenid-dipyrrinon rac. 46 dargestellt. Die Umlagerung der Vinyl-Gruppe von rac. 62 erfolgte mit Chloroform, das zuvor mit 4 N Salzsäure geschüttelt worden war. Das ^1H -NMR-Spektrum der isomerisierten Verbindung war identisch mit dem von Dipyrrinon 50, das aus der trans-konfigurierten Verbindung rac. 49 erhalten worden war. NOE-Experimente bewiesen die E-Konfiguration der Ethyliden-Doppelbindung.

Zur Untersuchung des Mechanismus wurde die Umlagerung der Dipyrrinone rac. 49 und rac. 62 mit 1 Tropfen d-TFA in CDCl_3 durchgeführt. Das ^1H -NMR-Spektrum zeigte, daß wieder aus beiden Edukten 50 entstanden war. Wie aus dem Integral hervorging, war die Methyl-Gruppe $\text{H}_3\text{C}(3^2)$ zu 33 %, die Methin-Position HC(5) zu ~30 % und Position HC(2) ebenfalls zu ~30 % deuteriert. Wurden während der Umlagerung, die ca. 3 h dauerte, ^1H -NMR-Spektren aufgenommen, so war nach ca. 10 Minuten neben Edukt rac. 49 bzw. rac. 62 auch ein Zwischenprodukt enthalten. In weiteren Messungen nahmen die Signale des Edukts immer mehr an Intensität ab, die des Zwischenprodukts blieben zunächst gleich, die des Produkts 50 nahmen immer mehr zu bis schließlich nur noch 50 enthalten war*. Bei Zwischenprodukt 64 handelt es sich aufgrund der ^1H -NMR-Signale wahrscheinlich um die in Abb. 46 gezeigte Verbindung. Ein

*In geringen Mengen wurde stets auch eine Oxidation des Edukts zum durchkonjugierten Dipyrrinon beobachtet.

Dublett ($J(2,2^1)=7.4$) bei 1.35 ppm wird der Methyl-Gruppe $H_3C(2^1)$ zugeordnet. Das Signal des Protons $HC(2)$ wird - überlagert mit dem Proton $HC(2)$ des Edukts - bei 3.29 ppm beobachtet. Die Vinyl-Gruppe bildet ein ABX-System bei 6.53 ppm ($H_XC(3^1)$) und 5.096 ppm ($H_A C(3^2)$, $J(3^1_X, 3^2_A)=10.8$, $J(3^2_A, 3^2_B)=0.9$) bzw. 5.089 ppm ($H_B C(3^2)$, $J(3^1_X, 3^2_B)=17.7$, $J(3^2_A, 3^2_B)=0.9$). Die der $H_2C(5)$ -Brücke zugehörigen Signale ließen sich nicht identifizieren, was auf den Deuterium-Austausch zurückgeführt werden kann.

Aufgrund des Zwischenprodukts 64 kann folgender Mechanismus angenommen werden (Abb. 46): Im ersten Schritt wird die Methin-Brücke $HC(5)$ protoniert, es entsteht das Iminium-Kation 63. Durch Abspaltung des Protons $HC(3)$ erhält man Zwischenprodukt 64. Protonierung an $C(3^2)$ zu 65 und Abspaltung eines Protons der $H_2C(5)$ -Brücke führt zu Verbindung 50 mit E-konfigurierter Doppelbindung. Daneben muß auch eine direkte Protonierung der Vinyl-Gruppe an $C(3^2)$ zu 66 postuliert werden, da die Methin-Position $HC(5)$ nur zu ~30 % deuteriert war.

Im Falle des Gallenfarbstoffs rac. 61 ist dagegen der erste Schritt wahrscheinlich die Protonierung des Stickstoffs $N(23)$, was zu Verbindung 67 und nach Deprotonierung von $HC(3)$ zu 68 führen könnte (Abb. 47). Erneute Protonierung an $C(3^2)$ würde 69 und nach Reorganisation des π -Systems unter Abspaltung eines Protons Z-PCB (20) liefern.

Der schnellere Reaktionsablauf beim Gallenfarbstoff im Vergleich zu den Dipyrrinonen läßt sich durch den ersten Schritt, nämlich die Protonierung des Stickstoffs bzw. der Methin-Position erklären. Für die unterschiedliche Stereochemie der Ethyliden-Gruppe läßt sich kein plausibler Grund nennen. Betrachtet man nur die Endprodukte, dann ist eine E-konfigurierte Ethyliden-Gruppe thermodynamisch stabiler aufgrund geringerer Wechselwirkungen des Protons $HC(3^1)$ mit dem Methin-Proton $HC(5)$.

Abb. 46: Mechanismus der Isomerisierung der Vinyl-dipyrrinone rac. 49 und rac. 62 zum Ethyliden-dipyrrinon 50. Übersichtlichkeit halber wurde bei den Übergangs- und Zwischenstufen auf die Darstellung der Stereochemie sowie auf mesomere Formen verzichtet.

Abb. 46:

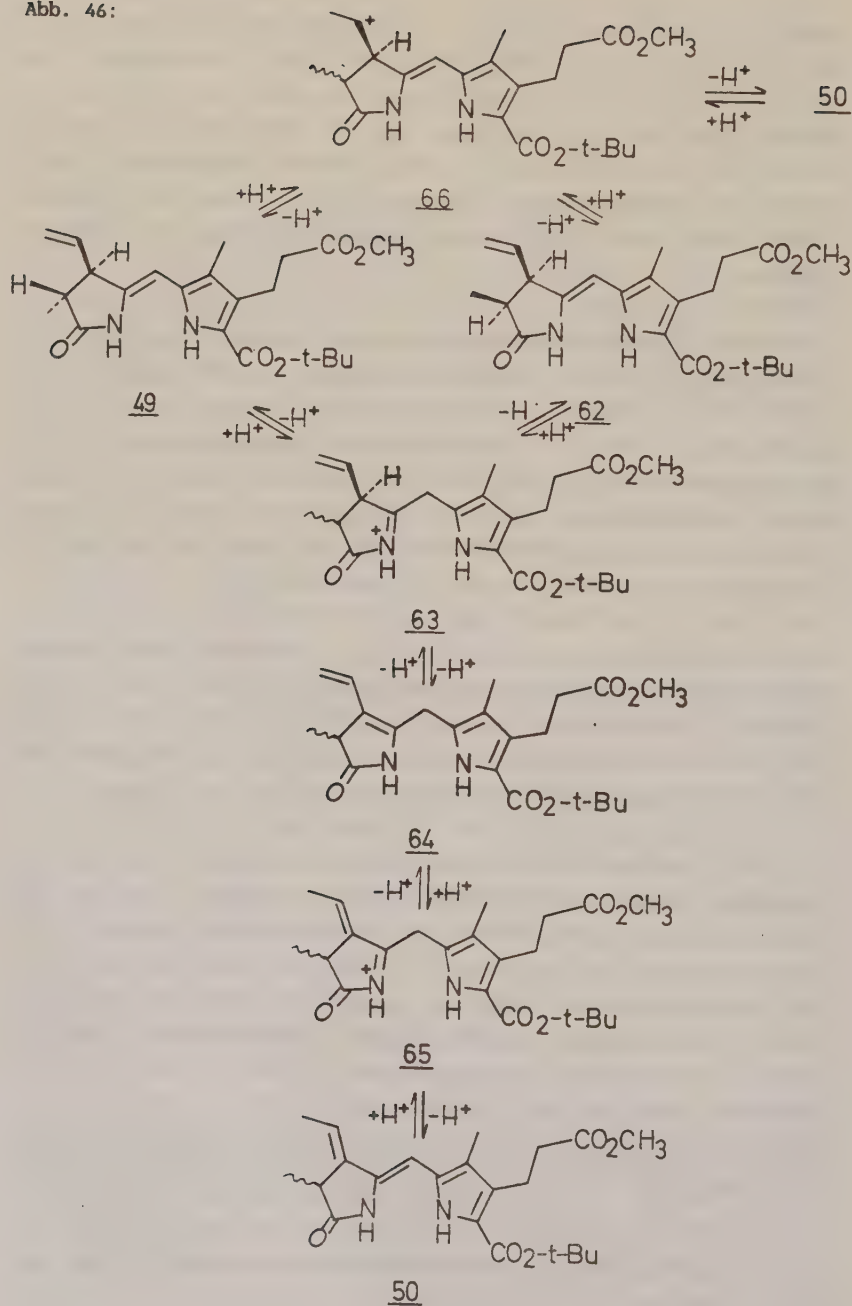
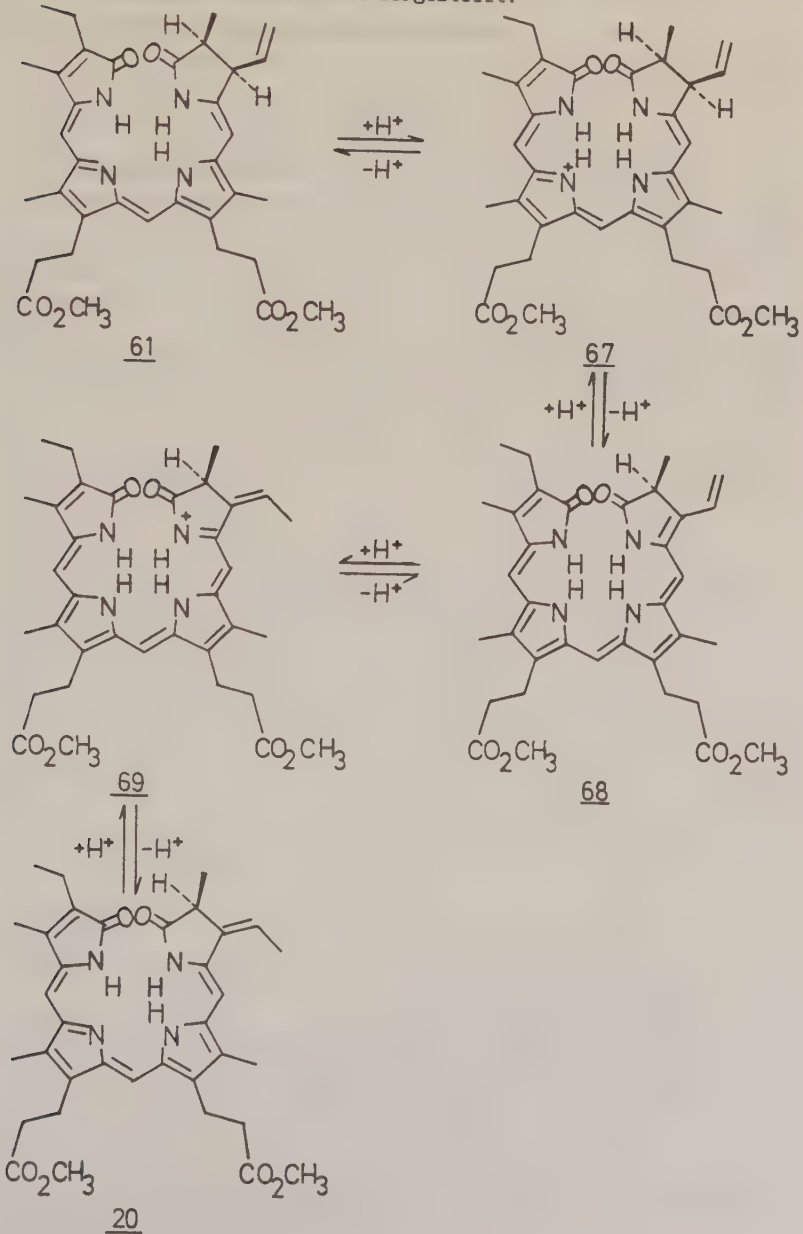


Abb. 47: Möglicher Mechanismus der Isomerisierung des Gallenfarbstoffs rac. 61 zu Z-PCBdme (20). Übersichtlichkeitshalber wurden mesomere Formeln nicht dargestellt.



3.5.8 Diskussion

Aufgrund der Instabilität von Chromophor rac. 61 gegenüber Säure ist eine Inkubation in wäßrigem Milieu mit Cyanidium caldarium III-D-2 oder auch mit einem Enzymrohextrakt wahrscheinlich nicht möglich. Die Isomerisierung von rac. 61 zu Z-PCB ist aber im Hinblick auf das von Beale und Brown [104] erhaltene Ergebnis bei der in-vitro-Inkubation von BV IX α mit einem Enzymrohextrakt aus Cyanidium caldarium interessant. Man beobachtete die Bildung von Z-PCB, das dann zu E-PCB umlagerte. Möglicherweise wird tatsächlich Gallenfarbstoff 61 bzw. sein Isomeres mit trans-Stellung der Protonen an Ring A biosynthetisch gebildet. Wenn das Apoprotein wie bei der in-vitro-Inkubation mit BV IX α [104] oder auch bei der Inkubation von 5-ALA mit Cyanidium caldarium im Dunklen nicht zur Verfügung steht, wird der Farbstoff ausgeschieden, aufgrund der schnellen Umlagerung beobachtet man aber nur Z- bzw. E-PCB. Hinweise, an welchen Chromophor das Apoprotein addiert wird, könnten Inkubationen mit Z-PCB bzw. E-PCB liefern.

4 Experimenteller Teil

4.1 Allgemeines

Geräte für das Arbeiten mit *Cyanidium caldarium*:

Autoklav: Dampfsterilisator Vapoclav 400 E, Sterico AG, Dietikon, Schweiz

Impfbank: BSH Laminar-Flow, Büttner-Schilde-Haas AG

Schüttler: Vielkolbenschüttler, VKS-75/A, E. Bühler, Tübingen

Zentrifugen: Kühlzentrifuge G 50 K, WKF, Brandau, Odenwald

Kühlzentrifuge PR 20, Jouan, St.-Nazaire cedex, Frankreich

Ultraschall-Homogenisator: Labsonic 1510, B. Braun

Arbeiten mit ^{14}C :

5-(4- ^{14}C)-ALA: Amersham Buchler GmbH & Co KG, Braunschweig

Szintillationscocktail: rotiszint 22, C. Roth KG, Karlsruhe

Szintillationszähler: Beckman LS-100 C Liquid Scintillation System, Fullerton, CA, USA

Chromatographie:

Säulenchromatographie (SC):

Kieselgel 60 (Korngrösse 0.040-0.063 mm) (230-400 mesh ASTM)

präparative Schichtchromatographie (PSC):

Kieselgel 60 PF₂₅₄₊₃₆₆, 20x20 Glasplatten, Schichtdicke: 1.5 mm

präparative Dünnschichtchromatographie (PDC):

Kieselgel 60 G, 20x20 Glasplatten, Schichtdicke: 1.0 mm

analytische Dünnschichtchromatographie (ADC):

DC-Alufolien, Kieselgel 60 F₂₅₄ (Schichtdicke: 0.2 mm)

HPTLC-Fertigplatten, Kieselgel 60 (ohne Fluoreszenzindikator)

Kieselgel, DC-Alufolien und HPTLC-Platten wurden von der Firma E. Merck, Darmstadt, bezogen.

Die Elution vom Kieselgel erfolgte mit Methylenchlorid/Methanol = 2/1, bzw. bei Gallenfarbstoffen mit Aceton.

Schmelzpunkte:

unkorrigiert

Heiztischmikroskop nach Kofler, Thermovar, Reichert AG, Wien

UV/VIS-Spektroskopie:

Wenn nicht anders angegeben, erfolgt die Angabe in $\lambda_{\max}(\lg \epsilon)$, Schultern werden mit sh bezeichnet.

Perkin Elmer 320 Spektrophotometer, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan

IR-Spektroskopie:

Die Banden $\bar{\nu}(\text{cm}^{-1})$ werden mit s=stark, m=mittel, w=schwach, br=breit

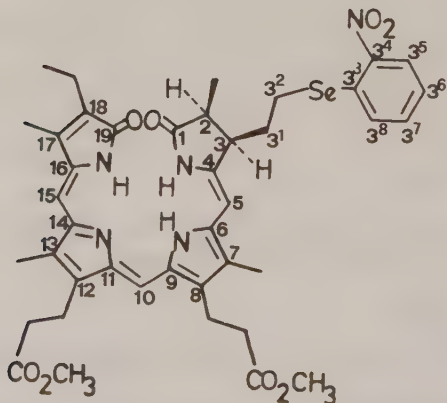
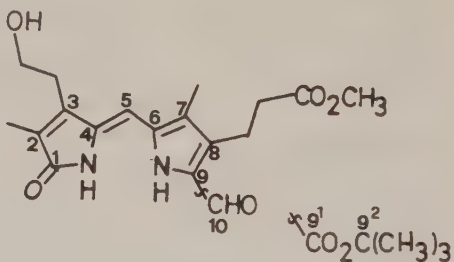
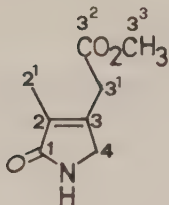
bezeichnet.

Perkin Elmer 599 IR Spektrophotometer, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan

NMR-Spektroskopie:

^1H - (360.13 MHz) und ^{13}C -NMR-Spektren (100.61 MHz) wurden mit TMS als internem Standard gemessen. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm angegeben bezüglich TMS=0. Die Multiplizität der Signale ist bezeichnet mit s=Singulett, d=Dublett, t=Triplett, q=Quartett, m=Multipllett, AB, AX usw. = AB-System bzw. AX-System usw. Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz angegeben.

Die Atomnumerierungen entsprechen nicht den IUPAC-Namen, sondern wurden - wenn nicht anders angegeben - aufgrund der leichteren Vergleichbarkeit wie folgt gewählt:



Die Ergebnisse von NOE-Experimenten sind in Tabellen angegeben, wobei 1 die beobachtete Signalverstärkung (δ in ppm) und 2 den Einstrahlort (δ in ppm) kennzeichnet. Die Zahlen in der Tabelle bedeuten % Signalverstärkung. Bei Protonen-empfindlichen Substanzen wurde das CDCl_3 zuerst 2x über neutrales Aluminiumoxid (Alumina Woelm N - Super I, Typ 4200, zur Säulenchromatographie) filtriert.

Bruker AM 360, Rechner: Aspekt 3000

Massenspektroskopie:

Die Angabe erfolgt in m/e (%). EI-Massenspektren (EI-MS) wurden bei einer Ionisationsenergie von 70 eV aufgenommen. FAB-Massenspektren (FAB-MS) wurden bei 6 kV Beschleunigungsspannung und Argon-Beschuß (8 kV, 1 mA) aufgenommen.

Vacuum Generators Micromass 7070 E, Datensystem DS 11-250 der Fa. VG Micromass Ltd., Manchester, UK; Ionisationskanone: Fa. IonTech

Elementaranalysen:

Perkin Elmer 240 CHN-Analyser, Norwalk, Connecticut, USA

Dünnschichtscanner:

Gemessen wurde bei 620 nm.

Camag TLC Scanner II mit angeschlossenem HP 200-Computer, MuttENZ, Schweiz

Chemikalien:

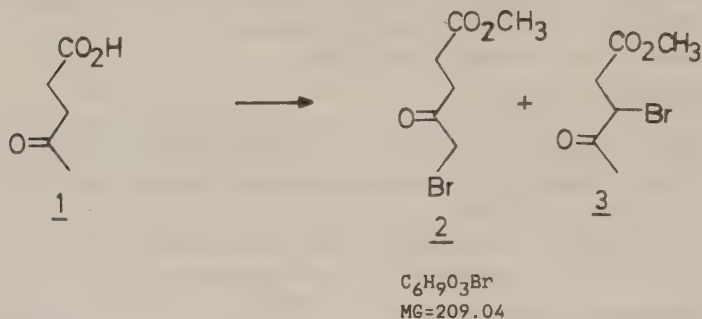
Porphyrin-Marker-Ester wurden von Porphyrin Products Inc. (Logan, USA) bezogen, alle übrigen Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt), Fluka (Buchs, Schweiz) und Sigma (St. Louis, USA). Lösungsmittel (LM) wurden destilliert.

Für alle Versuche wurde entionisiertes Wasser verwendet.

Spirulina geitleri wurde von Dr. W. Behr, Bonn, bezogen.

4.2 3 stufige Synthese von 5-Aminolävulinsäure-hydrochlorid (5-ALA)(5)

4.2.1 5-Bromlävulinsäure-methylester (2)[86]



Zu 92.8 g Lävulinsäure (1) in 800 ml Methanol wurden 128 g Brom so zugetropft, daß die Temperatur nicht über 30°C stieg. Der Ansatz wurde bei RT gerührt bis die Farbe hellgelb war (1-2 h), dann wurde 1 h unter Rückfluß gekocht. Nach Abziehen des Methanols am RV erfolgte Zugabe von Methylenchlorid und Wasser. Die organische Phase wurde 3x mit Wasser gewaschen, durch Filtration über Watte getrocknet und das LM am RV abgezogen. Reinigung und Trennung erfolgte durch fraktionierte Destillation am HV wie in der Literatur beschrieben.

Ausbeute 2: 93.6 g (56 %)

Sdp.: 100-119°C (0.11 Torr)

IR(CHCl₃):

3020w, 2950w, 2845w, 1735s, 1720s, 1438m, 1410m, 1395m, 1365m, 1355m, 1320m, 1210br, 1170m, 1080m, 1020w, 985w, 963w, 943w, 860w

¹H-NMR(CDCl₃):

3.97 (s, 2H, H₂C(5))

3.69 (s, 3H, H₃CO(6))

2.96 (t, J(2,3)=6.4, 2H, H₂C(3))

2.66 (t, J(2,3)=6.4, 2H, H₂C(2))

¹³C-NMR(CDCl₃):

200.39 (s, C(4))

172.60 (s, C(1))

51.77 (q, C(6))

34.35, 34.21 (je t, C(3), C(5))

27.99 (t, C(2))

EI-MS:

195 und 193 (je 3), M^+-CH_3
 179 und 177 (je 27), M^+-OCH_3
 123 und 121 (je 28), $BrCH_2CO^+$
 115 (100), M^+-CH_2Br
 95 und 93 (je 12), $BrCH_2^+$
 87 (18), M^+-OCCH_2Br

4.2.2 5-Phthalimidolävinlinsäure-methylester (4)

Zu einer Lösung von 80 g 2 in 300 ml DMF gab man langsam unter Rühren 80 g Phthalimid-Kalium. Nach Zugabe wurde noch 1 h bei RT gerührt, der Niederschlag abgenutscht und das Filtrat mit Methylenchlorid und Wasser versetzt. Die organische Phase wurde 4x mit 0.2 N Natronlauge, dann 3x mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das LM am RV abgezogen. Das Produkt wurde aus Methanol umkristallisiert.
 Ausbeute: 62.0 g (59 %)

Smp.: 97°C; Lit. [83]: 96-97°C

IR(KBr):

2955w, 2920w, 2850w, 1775m, 1740s, 1730s, 1710s, 1468w, 1445w, 1415s, 1387w, 1350m, 1310m, 1268w, 1200m, 1180m, 1102m, 1015w, 990w, 970w, 925w, 905w, 795w, 745w, 710m, 605w, 530w, 340w

¹H-NMR(CDCl₃):

7.90-7.85 (AA'XX', 2H, HC(9)+HC(9'))
 7.76-7.71 (AA'XX', 2H, HC(10)+HC(10'))
 4.56 (s, 2H, H₂C(5))
 3.69 (s, 3H, H₃CO(6))
 2.85 (t, J(2,3)=6.6, 2H, H₂C(3))
 2.67 (t, J(2,3)=6.6, 2H, H₂C(2))

^{13}C -NMR(CDCl₃):

200.61 (s, C(4))

172.47 (s, C(1))

167.50 (s, C(7)+C(7'))

134.13 (d, C(10)+C(10'))

132.03 (s, C(8)+C(8'))

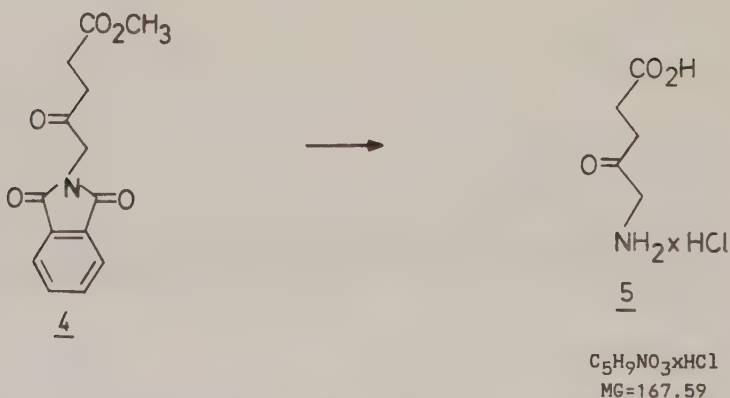
123.51 (d, C(9)+C(9'))

51.91 (q, C(6))

46.52 (t, C(5))

34.51 (t, C(3))

27.60 (t, C(2))

EI-MS:275 (3), M⁺244 (10), M⁺-OCH₃216 (18), M⁺-CO₂CH₃160 (69), C₈H₄O₂-NCH₂⁺115 (100), H₃CO₂CCH₂CH₂CO⁺4.2.3 5-Aminolävulinsäure-hydrochlorid (5-ALA)(5)[83]

20 g 4 wurden in 200 ml 6 N Salzsäure 8-10 h unter Rückfluß gekocht. Nach Abkühlung bei -20°C wurde die Phthalsäure abgenutscht und das Filtrat im Vakuumexsikkator über Kaliumhydroxid getrocknet. Das Produkt wurde aus Methanol/Isopropanol umkristallisiert.
Ausbeute: 11.2 g (92 %)

Smp.: 147°C; Lit. [83]: 149-151°C (aus Methanol)

IR(KBr):

3000br, 2710w, 2620w, 1715s, 1580w, 1470m, 1400w, 1370s, 1348m, 1300m, 1227w, 1213m, 1175w, 1140m, 1090m, 1035w, 985w, 970w, 935w, 850m,

765m, 645w, 615w

^{13}C -NMR(D₆-DMSO):

202.66 (s, C(4))

173.27 (s, C(1))

46.53 (t, C(5))

34.40 (t, C(3))

27.34 (t, C(2))

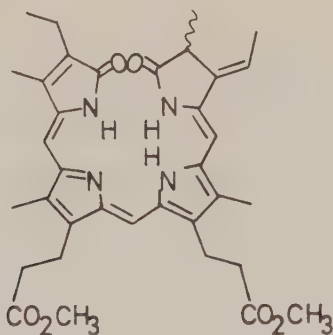
EI-MS:

131 (9), $\text{M}^+ - \text{HCl}$

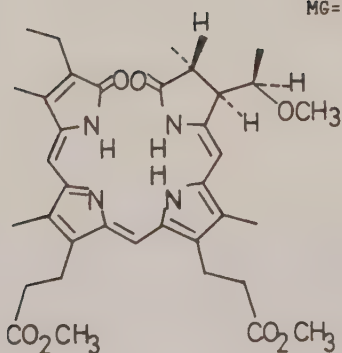
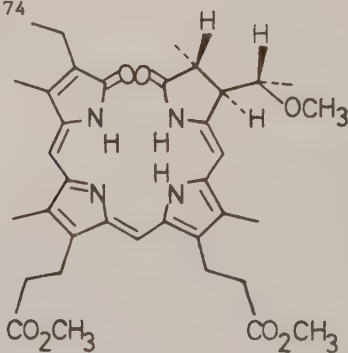
115 (25), $\text{M}^+ - \text{NH}_2\text{HCl}$

4.3 Darstellung von Vergleichsgallenfarbstoffen

4.3.1 (Z,Z,Z)-(2RS*)-18-Ethyl-3-(E)-ethyliden-8,12-bis-[2-(methoxycarbonyl)-ethyl]-1,2,3,19,22,24-hexahydro-2,7,13,17-tetramethyl-21H-bilin-1,19-dion (E-Phycocyanobilin-dimethylester = E-PCB-dme) (6) sowie (Z,Z,Z)-(2R,3R,3¹R)-18-Ethyl-8,12-bis-[2-(methoxycarbonyl)-ethyl]-3-(1-methoxyethyl)-1,2,3,19,22,24-hexahydro-2,7,13,17-tetramethyl-21H-bilin-1,19-dion (7) und (Z,Z,Z)-(2R,3R,3¹S)-18-Ethyl-8,12-bis-[2-(methoxycarbonyl)-ethyl]-3-(1-methoxyethyl)-1,2,3,19,22,24-hexahydro-2,7,13,17-tetramethyl-21H-bilin-1,19-dion (8) (= trans-Methanol-Addukte von Phycocyanobilin-dimethylester)

6

$C_{35}H_{42}N_4O_6$
MG=614.74

78

$C_{36}H_{46}N_4O_7$
MG=646.78

*Bei der Veresterung findet Racemisierung an C(2) statt.

50 g sprüh-getrocknete Spirulina geitleri (Cyanophyceae) wurden zur Entfernung von Chlorophyll a und Carotinoiden mehrmals mit insgesamt 1 l heißem Methanol extrahiert. Das Pulver wurde dann in 500 ml Methanol unter Stickstoff 8 h unter Rückfluß gekocht. Es wurde abgenutscht und das Pulver noch einmal zur Extraktion angesetzt. Dies wurde solange wiederholt, bis das Filtrat nur noch schwach gefärbt war. Das Filtrat wurde am RV zur Trockene gebracht und der blaue Rückstand mit 4 % Schwefelsäure in Methanol 1 h bei RT verestert. Nach Zugabe von Methylenchlorid wurde 3x mit Wasser gewaschen, die organische Phase durch Filtration über Watte getrocknet und das LM am RV abgezogen. Der Rückstand wurde durch PSC an Kieselgel gereinigt (Methylenchlorid/Essigsäure-ethylester = 1:1). Es wurden 2 Hauptprodukte isoliert, 6 (blau) und 7+8 (violett) (R_f 6 > R_f 7+8).

6:

UV/VIS:

	$\lambda_{\max}^{\text{UV}}$	$\lambda_{\max}^{\text{VIS}}$	$\frac{E_{\text{UV}}}{E_{\text{VIS}}}$
CHCl ₃	366	595	2.82
CH ₃ OH	365	598	2.95
CH ₃ OH+H ₂ SO ₄	375	692	1.28
CH ₃ OH+(CH ₃ CO ₂) ₂ Zn	375	662	1.16

IR(CHCl₃):

3432w, 3000w, 2960w, 2930w, 2878w, 2860w, 1730s, 1693s, 1620m, 1590m, 1540w, 1455m, 1440m, 1405w, 1380w, 1365w, 1310w, 1215br, 1165m, 1120w, 1100w, 962w, 890w

¹H-NMR(CDCl₃):

6.61 (s, 1H, HC(10))
 6.37 (dxq, J(2,3¹)=2.2, J(3¹,3²)=7.3, 1H, HC(3¹))
 5.97 (s, 1H, HC(15))
 5.81 (s, 1H, HC(5))
 3.68, 3.67 (je s, 6H, H₃CO(8⁴), H₃CO(12⁴))
 3.14 (dxqxq, J(2,3¹)=2.2, J(2,3²)=0.5, J(2,2¹)=7.5, 1H, HC(2))
 2.93 (t, J(12¹,12²)=7.6, 2H, H₂C(12¹))
 2.89 (t, J(8¹,8²)=7.6, 2H, H₂C(8¹))
 2.55 (t, J(12¹,12²)=7.6, 2H, H₂C(12²))
 2.54 (t, J(8¹,8²)=7.6, 2H, H₂C(8²))
 2.29 (q, J(18¹,18²)=7.5, 2H, H₂C(18¹))
 2.12 (s, 3H, H₃C(17¹))
 2.11 (s, 3H, H₃C(13¹))
 2.03 (s, 3H, H₃C(7¹))
 1.88 (dxd, J(2,3²)=0.5, J(3¹,3²)=7.3, 3H, H₃C(3²))
 1.33 (d, J(2,2¹)=7.5, 3H, H₃C(2¹))

1.08 (t, $J(18^1, 18^2)=7.5$, 3H, $H_3C(18^2)$)

NOE-Experimente:

1 \ 2	6.61	6.37	5.97	5.81	2.93	2.89	2.29	2.12	2.11	2.03
6.61					5.7					
6.37				13.0						
5.97								3.0		
5.81		12.8								4.0
2.93	10.1							0.7		
2.89										1.5
2.55	3.7				2.0			0.5		
2.54										0.7
2.29								0.1		
2.12										
2.11			13.1			1.3				
2.03				7.1	1.3					
1.88		9.7								
1.08							7.6	0.4		

FAB-MS(2-Nitrophenyl-octylether):

614, M^+

7+8:

UV/VIS:

	$\lambda_{\max}^{UV}$	$\lambda_{\max}^{VIS}$	$\frac{E_{UV}}{E_{VIS}}$
$CHCl_3$	347	585	2.14
CH_3OH	343	584	2.18
$CH_3OH+H_2SO_4$	350	656	1.14
$CH_3OH+(CH_3CO_2)_2Zn$	341, 377	647	1.03, 0.90

IR($CHCl_3$):

3420w, 2990w, 2970w, 2950w, 2922w, 2870w, 2850w, 2820w, 1730s, 1685s, 1627m, 1590m, 1455m, 1435m, 1400w, 1375w, 1350w, 1310w, 1260m, 1210br, 1155m, 1095m, 960w, 885w, 825w

1H -NMR($CDCl_3$):

6.65 +6.64 (je s, je 1H, HC(10))

5.98 +5.97 (je s, je 1H, HC(15))

5.602+5.598 (je d, $J(3,5)=1.4$, je 1H, HC(5))

3.69-3.63 (m, 2H, HC(3¹))

3.68 +3.66 (je s, je 6H, $H_3CO(8^4)+H_3CO(12^4)$)

3.41 +3.36 (je s, je 3H, $H_3CO(3^{1'})$)

3.04 (dxdd, $J(3,5)=1.4$, $J(2,3)\approx J(3,3^{1'})\approx 5$, 1H, HC(3))

- 2.95* (dxdd, $J(3,5)=1.4$, $J(2,3)\approx J(3,3^1)\approx 5$, 1H, HC(3))
 2.93 (t, $J(12^1,12^2)=7.6$, 4H, $H_2C(12^1)$)
 2.89 (t, $J(8^1,8^2)=7.6$, 4H, $H_2C(8^1)$)
 2.55 (t, $J(8^1,8^2)=J(12^1,12^2)=7.6$, 8H, $H_2C(8^2)+H_2C(12^2)$)
 2.54-2.44 (m, 2H, HC(2))
 2.31 +2.30 (je q, $J(18^1,18^2)=7.6$, je 2H, $H_2C(18^1)$)
 2.12 (s, 6H, $H_3C(17^1)$)
 2.11 (s, 6H, $H_3C(13^1)$)
 2.014+2.011 (je s, je 3H, $H_3C(7^1)$)
 1.26 +1.25 (je d, $J(2,2^1)=7.4$, je 3H, $H_3C(2^1)$)
 1.27 +1.19 (je d, $J(3^1,3^2)=6.2$, je 3H, $H_3C(3^2)$)
 1.092+1.086 (je t, $J(18^1,18^2)=7.6$, je 3H, $H_3C(18^2)$)

*Die chemische Verschiebung und die Kopplungskonstanten wurden durch NOE-Experimente bzw. Entkopplungen bestimmt, da dieses Signal im 1H -NMR-Spektrum von den beiden Triplets bei 2.93 und 2.89 ppm überlagert ist.

NOE-Experimente:

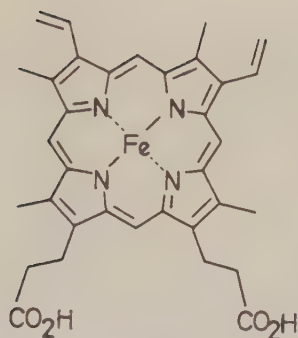
1 \ 2	6.65	5.98	5.602	2.95	2.31	2.12	2.11	2.014	1.27	1.19
2	6.64	5.97	5.598	2.89	2.30			2.011	1.25	
6.65 +6.64				5.4						
5.98 +5.97						2.9				
5.602								3.1		+
5.598									+	
3.69-3.63			6.9						+	+
3.41			+						+	0.7
3.36			+						1.3	
3.04			0.8						+	1.1
2.95			0.8						1.1	
2.93						1.1				
2.89	10.6							1.1		
2.55	3.0			1.7		1.0	0.6			
2.54-2.44									2.5	2.8
2.12		14.4								
2.11				0.9						
2.014+2.011			8.2	0.7						
1.092+1.086					5.7					

FAB-MS(2-Nitrophenyl-octylether):

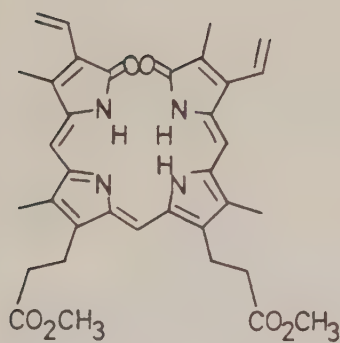
646, M^+

- 4.3.2 (Z,Z,Z)- 3,18-Diethenyl- 8,12-bis- [2-(methoxycarbonyl)-ethyl]-
1,19,22,24-tetrahydro-2,7,13,17-tetramethyl-21H-bilin-1,19-dion
(Biliverdin-dimethylester IX α = BVdme IX α)(9),
(Z,Z,Z)- 13,18-Diethenyl- 3,7-bis- [2-(methoxycarbonyl)-ethyl]-
1,19,22,24-tetrahydro-2,8,12,17-tetramethyl-21H-bilin-1,19-dion
(Biliverdin-dimethylester IX β = BVdme IX β)(10),
(Z,Z,Z)- 8,13-Diethenyl- 2,18-bis- [2-(methoxycarbonyl)-ethyl]-
1,19,22,24-tetrahydro-3,7,12,17-tetramethyl-21H-bilin-1,19-dion
(Biliverdin-dimethylester IX γ = BVdme IX γ)(11),
(Z,Z,Z)- 3,8-Diethenyl- 13,17-bis- [2-(methoxycarbonyl)-ethyl]-
1,19,22,24-tetrahydro-2,7,12,18-tetramethyl-21H-bilin-1,19-dion
(Biliverdin-dimethylester IX δ = BVdme IX δ)(12)

Die Reaktion wurde durchgeführt wie in Literatur [91] beschrieben. Reinigung und Trennung der Isomeren erfolgte durch Chromatographie. Der Reaktionsansatz wurde zunächst durch SC an Kieselgel (Methylenchlorid/Essigsäure-ethylester = 1:1) gereinigt, wobei gleichzeitig 12 von den 3 anderen, schneller laufenden Isomeren abgetrennt werden konnte. 12 wurde dann noch gereinigt durch PSC an Kieselgel (Hexan/Ethyl-Methyl-Keton/Eisessig = 10:5:1). Durch PSC (Methylenchlorid/Aceton = 9:1) ließ sich 10 von den langsamer laufenden Isomeren 9 und 11 trennen. 10 wurde gegebenenfalls noch gereinigt (Hexan/Ethyl-Methyl-Keton/Eisessig = 10:5:1). 9 und 11 wurden durch PSC getrennt (Hexan/Ethyl-Methyl-Keton/Eisessig = 10:5:1), wobei 11 über 9 chromatographierte.

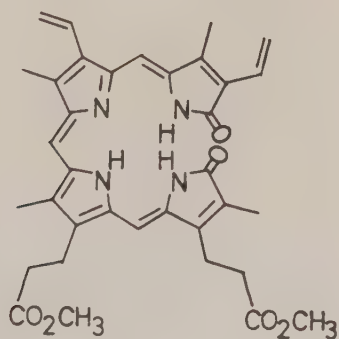


17
↓

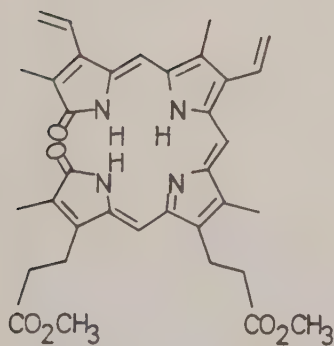


9

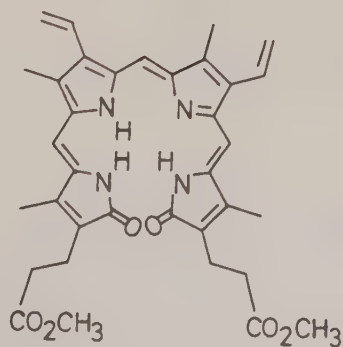
$\text{C}_{35}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_6$
MG=610.71



10



12



11

2:

UV/VIS:

	$\lambda_{\text{max}}^{\text{UV}}$	$\lambda_{\text{max}}^{\text{VIS}}$	$\frac{E^{\text{UV}}}{E^{\text{VIS}}}$
CHCl_3	380	660	3.80
CH_3OH	374	664	3.82
$\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{SO}_4$	376	695	2.16
$\text{CH}_3\text{OH} + (\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Zn}$	378	698	1.52

IR(CHCl_3):

3428w, 3000w, 2950m, 2920w, 2858w, 1730s, 1700s, 1585m, 1455m, 1435m,
 1415m, 1405m, 1360s, 1290m, 1265m, 1240m, 1162m, 1090m, 1015w, 985w,
 965w, 930w, 890w, 865w, 830w

 ^1H -NMR(CDCl_3):

6.79 (s, 1H, HC(10))

6.62 (AXxBX, $J(3^1_X, 3^2_A)=11.6$, $J(3^1_X, 3^2_B)=17.6$, 1H, $\text{H}_X\text{C}(3^1)$)6.50 (AXxMX, $J(18^1_X, 18^2_A)=11.5$, $J(18^1_X, 18^2_M)=17.6$, 1H, $\text{H}_X\text{C}(18^1)$)6.12 (AMxMX, $J(18^2_A, 18^2_M)=2.1$, $J(18^1_X, 18^2_M)=17.6$, 1H, $\text{H}_M\text{C}(18^2)$)

6.06 (s, 1H, HC(5))

6.01 (s, 1H, HC(15))

5.66 (ABxBX, $J(3^2_A, 3^2_B)=1.4$, $J(3^1_X, 3^2_B)=17.6$, 1H, $\text{H}_B\text{C}(3^2)$)5.64 (ABxAX, $J(3^2_A, 3^2_B)=1.4$, $J(3^1_X, 3^2_A)=11.6$, 1H, $\text{H}_A\text{C}(3^2)$)5.43 (AXxAM, $J(18^2_A, 18^2_M)=2.1$, $J(18^1_X, 18^2_A)=11.5$, 1H, $\text{H}_A\text{C}(18^2)$)3.68 (s, 6H, $\text{H}_3\text{CO}(8^4) + \text{H}_3\text{CO}(12^4)$)2.94, 2.93 (je t, $J(8^1, 8^2)=J(12^1, 12^2)=7.6$, 4H, $\text{H}_2\text{C}(8^1)$, $\text{H}_2\text{C}(12^1)$)2.56 (t, $J(8^1, 8^2)=J(12^1, 12^2)=7.6$, 4H, $\text{H}_2\text{C}(8^2) + \text{H}_2\text{C}(12^2)$)2.19 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(17^1)$)2.11 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(13^1)$)2.08 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(7^1)$)1.87 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(2^1)$)

NOE-Experimente:

1	2	6.79	6.62	6.50	6.12	6.06	6.01	5.43	2.19	2.11	2.08	1.87
6.62						8.4						0.8
6.50								7.6	2.4			
6.12								18.6				
6.06		4.8								1.0		
6.01									3.0	1.0		
5.66						1.9						1.3
5.64		3.3										
5.43				7.6	20.7							
2.94		9.4										
2.93										0.5		
2.56	3.0									0.3		
2.19				2.8			8.2					
2.11							5.6					
2.08						4.3						

FAB-MS(2-Nitrophenyl-octylether):610, M⁺10:UV/VIS:

	$\lambda_{\max}^{\text{UV}}$	$\lambda_{\max}^{\text{VIS}}$	$\frac{E^{\text{UV}}}{E^{\text{VIS}}}$
CHCl ₃	379	643	3.34
CH ₃ OH	374	656	3.45
CH ₃ OH+H ₂ SO ₄	374	695	1.82
CH ₃ OH+(CH ₃ CO ₂) ₂ Zn	384	698	1.57

IR(CHCl₃):

3430w, 3000w, 2960m, 2930s, 2860m, 1730s, 1700s, 1625w, 1585m, 1455m, 1440m, 1365m, 1265m, 1225br, 1170m, 1102w, 990w, 960w, 910w, 870w, 830w

¹H-NMR(CDCl₃):

6.83 (s, 1H, HC(10))

6.69 (AXxBX, J(13¹_X, 13²_A)=11.6, J(13¹_X, 13²_B)=17.8, 1H, H_XC(13¹))6.53 (AXxMX, J(18¹_X, 18²_A)=11.6, J(18¹_X, 18²_M)=17.7, 1H, H_XC(18¹))

6.22 (s, 1H, HC(15))

6.15 (MX*, J(18¹_X, 18²_M)=17.7, 1H, H_MC(18²))

6.09 (s, 1H, HC(5))

5.47 (AX*, J(18¹_X, 18²_A)=11.6, 1H, H_AC(18²))

*Die AM-Kopplung konnte nicht bestimmt werden.

- 5.46 (ABxBX, $J(13^2_A, 13^2_B)=1.5$, $J(13^1_X, 13^2_B)=17.8$, 1H, $H_B C(13^2)$)
 5.42 (ABxAX, $J(13^2_A, 13^2_B)=1.5$, $J(13^1_X, 13^2_A)=11.6$, 1H, $H_A C(13^2)$)
 3.72, 3.67 (je s, 6H, $H_3CO(3^4)$, $H_3CO(7^4)$)
 2.86 (t, $J(3^1, 3^2)=J(7^1, 7^2)=7.6$, 4H, $H_2C(3^1) + H_2C(7^1)$)
 2.66 (t, $J(3^1, 3^2)=7.6$, 2H, $H_2C(3^2)$)
 2.53 (t, $J(7^1, 7^2)=7.6$, 2H, $H_2C(7^2)$)
 2.32 (s, 3H, $H_3C(12^1)$)
 2.23 (s, 3H, $H_3C(8^1)$)
 2.21 (s, 3H, $H_3C(17^1)$)
 1.81 (s, 3H, $H_3C(2^1)$)

NOE-Experimente:

1	2	6.83	6.22	6.15	6.09	2.86	2.32	2.23	2.21	1.81
6.83							2.4	2.1		
6.69			5.5				0.8			
6.53									3.0	
6.22									2.9	
6.09						4.8				
5.47				7.1						
5.46		13.2					0.6			
2.86				8.9				0.2		0.2
2.66				2.3	0.5					+
2.53				1.4	1.9					
2.32	5.5									
2.23	4.8					0.9				
2.21		8.7		1.6						
1.81						0.9				

FAB-MS(2-Nitrophenyl-octylether):

610, M^+

11:

UV/VIS:

	$\lambda_{\max}^{\text{UV}}$	$\lambda_{\max}^{\text{VIS}}$	$\frac{E^{\text{UV}}}{E^{\text{VIS}}}$
CHCl_3	375	636	3.15
CH_3OH	370	649	3.47
$\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{SO}_4$	356	697	1.65
$\text{CH}_3\text{OH} + (\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Zn}$	377	696	2.14

IR(CHCl_3):

3435w, 3000w, 2950m, 2930m, 2860w, 1730s, 1700s, 1625m, 1585m, 1455w,
 1440m, 1390w, 1365w, 1270w, 1210br, 1175m, 1135m, 1100w, 1060w, 988m,
 910w, 830w

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$:

6.79 (s, 1H, HC(10))
 6.74 (AXxBX, $J(8^1_X, 8^2_A)=11.6$, $J(8^1_X, 8^2_B)=17.8$, 1H, $\text{H}_X\text{C}(8^1)$)
 6.60 (AXxBX, $J(13^1_X, 13^2_A)=11.6$, $J(13^1_X, 13^2_B)=17.7$, 1H, $\text{H}_X\text{C}(13^1)$)
 5.96 (s, 1H, HC(15))
 5.84 (s, 1H, HC(5))
 5.49 (ABxBX, $J(8^2_A, 8^2_B)=1.4$, $J(8^1_X, 8^2_B)=17.8$, 1H, $\text{H}_B\text{C}(8^2)$)
 5.46 (ABxAX, $J(8^2_A, 8^2_B)=1.4$, $J(8^1_X, 8^2_A)=11.6$, 1H, $\text{H}_A\text{C}(8^2)$)
 5.41 (ABxBX, $J(13^2_A, 13^2_B)=1.4$, $J(13^1_X, 13^2_B)=17.7$, 1H, $\text{H}_B\text{C}(13^2)$)
 5.39 (ABxAX, $J(13^2_A, 13^2_B)=1.4$, $J(13^1_X, 13^2_A)=11.6$, 1H, $\text{H}_A\text{C}(13^2)$)
 3.66 (s, 6H, $\text{H}_3\text{CO}(2^4) + \text{H}_3\text{CO}(18^4)$)
 2.54 (s, 8H, $\text{H}_2\text{C}(2^1) + \text{H}_2\text{C}(2^2) + \text{H}_2\text{C}(18^1) + \text{H}_2\text{C}(18^2)$)
 2.24 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(12^1)$)
 2.14 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(7^1)$)
 2.10 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(3^1)$)
 2.09 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(17^1)$)

NOE-Experimente:

1 2	6.79	6.74	5.96	5.84	2.54	2.10	2.09
6.60			6.1				
5.96						3.2	
5.84						3.8	
5.49	19.2						
5.46							
5.41			1.9				
2.54						2.4	
2.24	7.0						
2.14				6.7			
2.10				6.7	0.8		
2.09			8.0		0.8		

FAB-MS(2-Nitrophenyl-octylether):610, M^+ 12:UV/VIS:

	$\lambda_{\text{max}}^{\text{UV}}$	$\lambda_{\text{max}}^{\text{VIS}}$	$\frac{\epsilon^{\text{UV}}}{\epsilon^{\text{VIS}}}$
CHCl_3	376	656	2.97
CH_3OH	371	654	2.99
$\text{CH}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{SO}_4$	365	694	1.54
$\text{CH}_3\text{OH}+(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Zn}$	380	694	2.02

IR(CHCl₃):

3630w, 3430br, 3000m, 2950m, 2930m, 2858w, 1730s, 1700s, 1625m, 1590m, 1495w, 1460m, 1440m, 1365m, 1265s, 1225br, 1170m, 1135m, 1105m, 1075w, 1015m, 985w, 960w, 910w, 895w, 865w, 830w

¹H-NMR(CDCl₃):

6.85 (s, 1H, HC(10))

6.78 (AXxBX, J(8¹_X, 8²_A)=11.3, J(8¹_X, 8²_B)=17.9, 1H, H_XC(8¹))

6.63 (AXxBX, J(3¹_X, 3²_A)=11.4, J(3¹_X, 3²_B)=17.9, 1H, H_XC(3¹))

6.09 (s, 1H, HC(5))

6.03 (s, 1H, HC(15))

5.68 (ABxBX, J(3²_A, 3²_B)=1.3, J(3¹_X, 3²_B)=17.9, 1H, H_BC(3²))

5.65 (ABxAAX, J(3²_A, 3²_B)=1.3, J(3¹_X, 3²_A)=11.4, 1H, H_AC(3²))

5.52 (ABxBX, J(8²_A, 8²_B)=1.5, J(8¹_X, 8²_B)=17.9, 1H, H_BC(8²))

5.46 (ABxAAX, J(8²_A, 8²_B)=1.5, J(8¹_X, 8²_A)=11.3, 1H, H_AC(8²))

3.71, 3.67 (je s, 6H, H₃CO(13⁴), H₃CO(17⁴))

2.85 (t, J(17¹, 17²)=7.4, 2H, H₂C(17¹))

2.83 (t, J(13¹, 13²)=7.4, 2H, H₂C(13¹))

2.66 (t, J(17¹, 17²)=7.4, 2H, H₂C(17²))

2.52 (t, J(13¹, 13²)=7.4, 2H, H₂C(13²))

2.20 (s, 3H, H₃C(12¹))

2.17 (s, 3H, H₃C(7¹))

1.93 (s, 3H, H₃C(2¹))

1.84 (s, 3H, H₃C(18¹))

NOE-Experimente:

1 \ 2	6.85	6.78	6.09	6.03	2.85	2.83	2.20	2.17	1.93	1.84
6.85							3.0			
6.78										
6.63			5.7						1.1	
6.09							2.0			
6.03					4.6					
5.68									1.5	
5.52							1.2			
5.46	2.4									
2.85										0.5
2.83				9.9			1.3			
2.66				2.7						
2.52				2.2	1.1					
2.20		4.5			0.7					
2.17		+	6.4							
1.84					0.9					

FAB-MS(2-Nitrophenyl-octylether):

610, M⁺

- 4.4 Nachweis von Biliverdin IX α (BV IX α)(2) sowie Strukturaufklärung eines 3¹-Hydroxy-Mesobiliverdins IX α (OH-MBV)(21) aus dem Medium von Cyanidium caldarium III-D-2 nach Inkubation mit 5-Aminolävulinsäure-hydrochlorid (5-ALA)(5)

4.4.1 Cyanidium caldarium III-D-2: Anzucht und Inkubation

4.4.1.1 Medien für die heterotrophe Anzucht sowie für die Inkubation

Minimalmedium nach Allen [126], modifiziert nach Troxler:

Stammlösungen	g/l Stammlösung	ml Stammlösung/ l Medium
Schwefelsäure	9.8 H ₂ SO ₄	10
Calciumchlorid	1.47 CaCl ₂ x2H ₂ O	10
Kaliumdihydrogenphosphat	27.2 KH ₂ PO ₄	10
Magnesiumsulfat	24.65 MgSO ₄ x7H ₂ O	10
Ammoniumchlorid	53.49 NH ₄ Cl	10
Eisen-EDTA	0.386 FeCl ₃ x6H ₂ O	10
	0.59 Na ₂ EDTAx2H ₂ O	
Spurenelemente	0.028 Na ₃ VO ₄ x14H ₂ O	3
	0.034 ZnCl ₂	
	0.008 Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O	
	0.016 Co(NO ₃) ₂ x6H ₂ O	
	0.58 MnCl ₂ x4H ₂ O	
	1.42 Na ₂ B ₄ O ₇ x10H ₂ O	
	0.024 CuSO ₄ x5H ₂ O	

<u>heterotrophe Anzucht:</u>	Minimalmedium + 1 % D-(+)-Glucose
<u>5-ALA-Inkubationsmedium:</u>	Minimalmedium + 1 % D-(+)-Glucose + 2.84 g 5-ALA (5)
<u>E-PCB-Inkubationsmedium:</u>	Minimalmedium + 1 % D-(+)-Glucose + E-PCB (6, unverestert)(vgl. 4.4.1.2)
<u>OH-MBV-Inkubationsmedium:</u>	Minimalmedium + 1 % D-(+)-Glucose + OH-MBV (21, unverestert)(vgl. 4.4.1.2)

4.4.1.2 Anzucht und Inkubationsbedingungen

Zur Anzucht und Inkubation wurden 1.8 l Fernbachkolben mit 1 l Medium oder 250 ml Erlenmeyerkolben (Enghals) mit 150 ml Medium verwendet. Die Gefäße wurden mit Wattestopfen und Aluminiumfolie verschlossen und 30 Minuten bei 120°C, 1.1 bar, sterilisiert. Nach Animpfen mit 100 ml bzw. 15 ml einer Stammkultur wurden die Kolben lichtundurchlässig verschlossen und bei 27-29°C auf einem Schüttler, 120 upm, gehalten. Nach 6-8 Tagen konnte geerntet werden. Für die Inkubation mit 5-ALA

(5) wurde 1 l heterotroph gezogene Algenkultur steril abzentrifugiert (16 800 upm, 15 Minuten, 4°C) und die Algen in 150 ml Inkubationsmedium suspendiert. Für ^{14}C -Markierungsexperimente setzte man $10\ \mu\text{Ci} = 2.22 \times 10^6\ \text{dpm}$ 5-(4- ^{14}C)-ALA zu. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln, ebenfalls bei 27-29°C auf dem Schüttler. Nach 2-3 Tagen begann die Pigmentausscheidung. Zur Gewinnung größerer Farbstoffmengen wurde erst nach 5-14 Tagen Inkubation abzentrifugiert, die Algen 1x gewaschen und das Waschwasser zum tiefblau gefärbten Medienüberstand gegeben.

Für die Inkubation mit E-PCB wurden 15 l heterotroph gezogene Algenkultur steril abzentrifugiert und in 2.1 l Medium aufgenommen. In 24 sterile 250 ml-Erlenmeyerkolben gab man je 90 ml dieser Algensuspension. 6 Kolben versetzte man zusätzlich mit 1 ml einer 5-ALA-Lösung (1.7 g 5-ALAxHCl/6 ml sterilem Medium). Alle 24 Kolben wurden dann bei 27-29°C im Dunkeln auf dem Schüttler inkubiert. Nach 2 Tagen begann in den Ansätzen mit 5-ALA die Pigmentausscheidung. Nun wurde steril zu den anderen 18 Kolben E-PCB zugesetzt und zwar zu je 6 Kolben 0.5 ml (0.1 mg), 1.0 ml (0.2 mg) bzw. 4.0 ml (0.8 mg) einer ethanolischen Lösung. Außerdem gab man zu 18 Erlenmeyerkolben mit je 90 ml Medium E-PCB, ebenfalls zu je 6 Kolben 0.5 ml, 1.0 ml und 4.0 ml der ethanolischen Lösung. Die Menge an E-PCB wurde mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten bestimmt ($E=12\ 300$). Das E-PCB war aus Spirulina geitleri gewonnen worden wie unter 4.3.1 beschrieben. Es wurde aber nicht verestert, die Reinigung erfolgte durch Chromatographie (SC und PSC) an Kieselgel (Methylenchlorid/Essigsäure-ethylester/Methanol = 20:20:7). Die Aufarbeitung der Inkubationsansätze erfolgte nach 1 Tag, 3 Tagen bzw. 7 Tagen, wobei jeweils 2 Parallelproben aufgearbeitet wurden, also insgesamt 14 Ansätze.

Für die Inkubation mit OH-MBV (21) wurden ebenfalls heterotroph gezogene Algen verwendet und wie oben beschrieben konzentriert. Zu 2 Kolben mit je 90 ml Algensuspension gab man steril 1 ml (0.23 mg) einer ethanolischen Lösung von OH-MBV, das aus dem Medienüberstand von Cyanidium caldarium gewonnen worden war. 3 Kolben mit je 90 ml Medium wurden mit je 1 ml (0.21 mg) einer ethanolischen Lösung von OH-MBV versetzt, das aus der Inkubation von E-PCB in Medium gewonnen worden war. Die Verseifung des Esters 21 erfolgte mit 6 N Salzsäure, 1 h bei RT. Die Menge OH-MBV wurde über die Extinktion bestimmt, wobei ein Extinktionskoeffizient von 15 000 angenommen wurde. Inkubation erfolgte wie oben beschrieben, aufgearbeitet wurde je ein Ansatz nach 1 Tag, nach 3 Tagen und im Falle der Inkubation mit Medium nach 7 Tagen.

4.4.2 Isolierung der Pigmente

4.4.2.1 aus dem Medium

Nach Inkubation wurden die Algen abzentrifugiert (16 800 upm, 15 Minuten, 4°C), 1x mit Wasser gewaschen und das Waschwasser zum Medienüberstand gegeben. Der Medienüberstand wurde mit n-Butanol extrahiert, die organische Phase 2x mit Wasser gewaschen und am RV abgezogen. Die Pigmente wurden mit 4 % Schwefelsäure in Methanol verestert, entweder 1 h bei RT oder während der Nacht bei -20°C. Nach Zugabe von Methylenchlorid wurde mit Wasser bis zur Phasentrennung versetzt, die organische Phase abgetrennt, 2x mit Wasser gewaschen, durch Filtration über Watte getrocknet und das LM am RV abgezogen. Das Pigmentgemisch wurde durch PSC an Kieselgel getrennt (Methylenchlorid/Essigsäure-ethylester = 1:1 und Benzol/Petrolether (40-60°C)/Methanol/Essigsäure-ethylester = 48.5:40.0:10.5:9.0). Die Pigmente aus den E-PCB- und OH-MBV-Inkubationsexperimenten wurden nur analytisch auf HPTLC-Platten getrennt (Methylenchlorid/Essigsäure-ethylester = 1:1), von denen dann Chromatogramme mit dem Dünnschichtscanner angefertigt wurden.

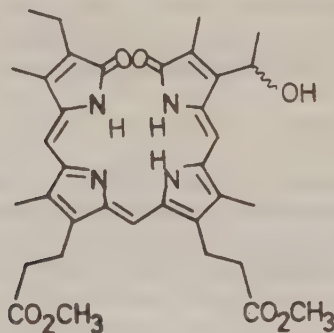
4.4.2.2 aus den Zellen

Die vom Medienüberstand abzentrifugierten und mit Wasser gewaschenen Algen wurden 2x mit Methanol extrahiert, um außen an der Zelloberfläche adsorbierte Pigmente zu entfernen. Die mit Methanol extrahierten Pigmente wurden getrennt verestert. Die Algen wurden dann zur Entfernung von Carotinoiden 4x mit DMSO extrahiert. Der Zellaufschluß erfolgte in DMSO durch Ultraschallbehandlung (45 Minuten, 400 Watt), gekühlt wurde mit Eiswasser. Nach dem Aufschluß versetzte man mit dem 4-5-fachen Volumen an Eiswasser und zentrifugierte ab (15 Minuten, 16 800 upm). Der Überstand wurde zur Entfernung von Lipiden 3x mit Hexan extrahiert, anschließend wurde verfahren wie oben für den Medienüberstand beschrieben.

4.4.3 Chrmsäureabbau von ^{14}C -markierten Pigmenten

Von den gereinigten Pigmenten ^{14}C -PCBdme (6), ^{14}C -BVDme IX α (9) und ^{14}C -OH-MBVdme (21) wurde ein Aliquot zur Bestimmung der Aktivität entnommen, der Rest wurde direkt auf der Platte abgebaut [97]. Zur Radioaktivitätsmessung wurden die Imide nicht eluiert, sondern mit dem Kieselgel sowie 10 ml Szintillationsflüssigkeit in ein Szintillationsgläschen gegeben. Die gemessenen cpm-Werte wurden unter Berücksichtigung der Zählausebeute (62.1 %) und mittels einer Quenchkurve in dpm umgerechnet.

4.4.4 (Z,Z,Z)-8,12-bis-[2-(Methoxycarbonyl)-ethyl]-18-ethyl-3-(1-hydroxyethyl)-1,19,22,24 -tetrahydro-2,7,13,17 -tetramethyl-21H-bilin-1,19-dion (3 1 -Hydroxy-Mesobiliverdin-dimethylester IX α = OH-MBVdme) (21)



21

$\text{C}_{35}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_7$

MG=630.74

UV/VIS:

	$\lambda_{\text{max}}^{\text{UV}}$	$\lambda_{\text{max}}^{\text{VIS}}$	$\frac{E_{\text{UV}}}{E_{\text{VIS}}}$
CHCl_3	370	643	3.32
CH_3OH	365	635	3.60
$\text{CH}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{SO}_4$	356	683	2.07
$\text{CH}_3\text{OH}+(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Zn}$	370	688	1.55

IR(CHCl_3):

3430w, 3220br, 2992w, 2950m, 2920m, 2850w, 1730s, 1690s, 1650m, 1600m,

1525w, 1455m, 1440m, 1395w, 1360m, 1275m, 1225br, 1165m, 1105m, 1010w, 985w, 965w, 930w, 895w

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3):

6.87 (s, 1H, HC(10))
 6.50 (s, 1H, HC(5))
 6.01 (s, 1H, HC(15))
 5.08 (q, $J(3^1, 3^2)=6.7$, 1H, HC(3¹))
 3.69, 3.68 (je s, 6H, $\text{H}_3\text{CO}(8^4)$, $\text{H}_3\text{CO}(12^4)$)
 2.96, 2.95 (je t, $J(8^1, 8^2)=J(12^1, 12^2)=7.6$, 4H, $\text{H}_2\text{C}(8^1)$, $\text{H}_2\text{C}(12^1)$)
 2.58 (t, $J(8^1, 8^2)=J(12^1, 12^2)=7.6$, 4H, $\text{H}_2\text{C}(8^2)$ + $\text{H}_2\text{C}(12^2)$)
 2.29 (q, $J(18^1, 18^2)=7.5$, 2H, $\text{H}_2\text{C}(18^1)$)
 2.120(s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(7^1)$)
 2.126, 2.115 (je s, 6H, $\text{H}_3\text{C}(13^1)$, $\text{H}_3\text{C}(17^1)$)
 1.93 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(2^1)$)
 1.60 (d, $J(3^1, 3^2)=6.7$, 3H, $\text{H}_3\text{C}(3^2)$)
 1.07 (t, $J(18^1, 18^2)=7.5$, 3H, $\text{H}_3\text{C}(18^2)$)

NOE-Experimente:

1	2	6.87	6.50	6.01	5.08	2.96	2.95	2.29
6.87						3.9		
6.50					1.6			
5.08			4.4					
2.96								
2.95		7.9						
2.58						3.7		
2.126				4.7				
2.120			3.6			1.3		
2.115				4.7				
1.60					1.8			
1.07								2.4

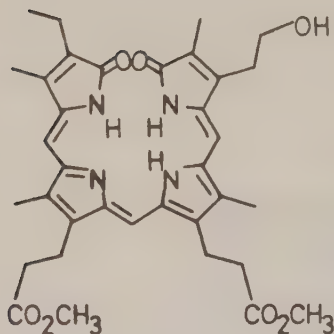
FAB-MS(Glycerin):

631 (8), (M+1)⁺

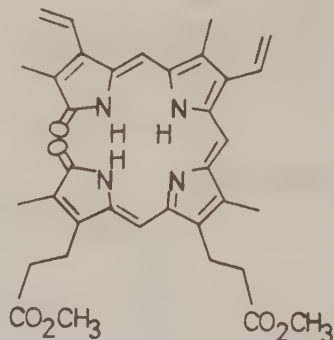
614 (4), (M+1-OH)⁺

4.5 Gallenfarbstoffe aus den Ovarien von Turbo cornutus

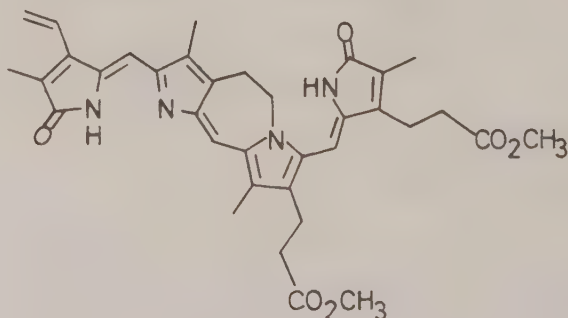
4.5.1 Isolierung der Gallenfarbstoffe: (Z,Z,Z)-8,12-bis-[2-(Methoxycarbonyl)-ethyl] -18-ethyl-3-(2-hydroxyethyl)-1,19,22,24-tetrahydro-2,7,13,17-tetramethyl-21H-bilin-1,19-dion (Turboverdin) (22), (Z,Z,Z)-3,8-Diethenyl-13,17-bis-[2-(methoxycarbonyl)-ethyl]-1,19,22,24-tetrahydro-2,7,12,18-tetramethyl-21H-bilin-1,19-dion (Biliverdin-dimethylester IXδ = BVDme IXδ) (12) und (Z,E,Z) -13,17-bis-[2-(Methoxycarbonyl)-ethyl] -8,23-ethano-3-ethenyl-1,19,23,24-tetrahydro-2,7,12,18- tetramethyl-21H-bilin-1,19-dion (Neobiliverdin-dimethylester IXδ = NBVDme IXδ) (23)

22

$C_{35}H_{42}N_4O_7$
MG=630.74

12

$C_{35}H_{38}N_4O_6$
MG=610.71

23

$C_{35}H_{38}N_4O_6$
MG=610.71

80 g gefriergetrocknete Ovarien von Turbo cornutus wurden mehrmals mit insgesamt 4 l 2 % Salzsäure in Aceton extrahiert. Das Aceton wurde am

RV auf ca. 300 ml eingeeengt und mit 1 l Wasser versetzt. Es wurde 2x extrahiert mit Essigsäure-ethylester zur Entfernung von Carotinoiden und 1x mit Diethylether zur Entfernung von Lipiden. Die Gallenfarbstoffe wurden dann mit n-Butanol extrahiert. Die organische Phase wurde 2x mit Wasser gewaschen und das LM am RV abgezogen. Es erfolgte Veresterung mit 4 % Schwefelsäure in Methanol, 1 h bei RT. Die Pigmente wurden durch DC auf Kieselgel (ohne Fluoreszenzindikator) (Methylenchlorid/Essigsäure-ethylester = 1:1) gereinigt und getrennt, wobei 12 über 22 und dieses wiederum über 23 chromatographierte.

22:

UV/VIS:

	$\lambda_{\text{max}}^{\text{UV}}$	$\lambda_{\text{max}}^{\text{VIS}}$	$\frac{E^{\text{UV}}}{E^{\text{VIS}}}$
CHCl_3	370	652	3.31
CH_3OH	364	645	3.49
$\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{SO}_4$	360	685	1.73
$\text{CH}_3\text{OH} + (\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Zn}$	370	688	1.43

IR(CHCl_3):

3430br, 3000m, 2955m, 2930m, 2860m, 1730s, 1690s, 1625m, 1580m, 1530w, 1455m, 1435m, 1395m, 1360m, 1230br, 1165m, 1095m, 1045w, 960w, 885w, 825w

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3):

6.89 (s, 1H, HC(10))
 6.07 (s, 1H, HC(5))
 6.03 (s, 1H, HC(15))
 3.94 (t, $J(3^1, 3^2)=5.2$, 2H, $\text{H}_2\text{C}(3^2)$)
 3.68 (s, 6H, $\text{H}_3\text{C}(8^4) + \text{H}_3\text{C}(12^4)$)
 2.97, 2.96 (je t, $J(8^1, 8^2)=J(12^1, 12^2)=7.6$, 4H, $\text{H}_2\text{C}(8^1)$, $\text{H}_2\text{C}(12^1)$)
 2.77 (t, $J(3^1, 3^2)=5.2$, 2H, $\text{H}_2\text{C}(3^1)$)
 2.58 (t, $J(8^1, 8^2)=J(12^1, 12^2)=7.6$, 4H, $\text{H}_2\text{C}(8^2) + \text{H}_2\text{C}(12^2)$)
 2.27 (q, $J(18^1, 18^2)=7.6$, 2H, $\text{H}_2\text{C}(18^1)$)
 2.13 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(7^1)$)
 2.12 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(13^1)$)
 2.11 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(17^1)$)
 1.88 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(2^1)$)
 1.06 (t, $J(18^1, 18^2)=7.6$, 3H, $\text{H}_3\text{C}(18^2)$)

NOE-Experimente:

1 \ 2	6.89	6.07	6.03	2.97	2.96	2.77	2.27	2.13	2.12	2.11	1.88
6.89				9.2							
6.07						5.9			0.8		
6.03									1.8		
3.94		1.3				3.3					0.6
2.97											
2.96	9.1								0.7		
2.77		4.3									1.0
2.58	4.1			9.8					0.4		
2.13		3.6		4.6							
2.12			10.8								
2.11			8.8								
1.88						2.6					
1.06							6.0				

FAB-MS(Glycerin):631, (M+1)⁺12:

Für spektroskopische Daten vgl. 4.3.2.

23:UV/VIS:CHCl₃ 560(1), 367(0.19), 310(0.41), 266(0.61)CH₃OH 572(1), 366(0.18), 310(0.35), 265(0.45)CH₃OH+H₂SO 624(1), 367(0.15), 324(0.24), 262(0.35)CH₃OH+(CH₃CO₂)₂Zn 600(1), 360(sh), 324(0.35), 262(0.65)IR(CHCl₃):

3220br, 2950m, 2930m, 2855m, 1735m, 1690s, 1600m, 1560w, 1460w, 1440w,
 1405w, 1380w, 1355m, 1325w, 1295m, 1270w, 1165m, 1145m, 1110w, 980w,
 945w, 910w, 860w, 830w, 725w

¹H-NMR(CDCl₃):

7.30 (s, 1H, HC(10))

6.63 (AXxBX, J(3¹_X, 3²_A)=11.5, J(3¹_X, 3²_B)=18.5, 1H, H_XC(3¹))

6.02 (s, 1H, HC(5))

6.00 (s, 1H, HC(15))

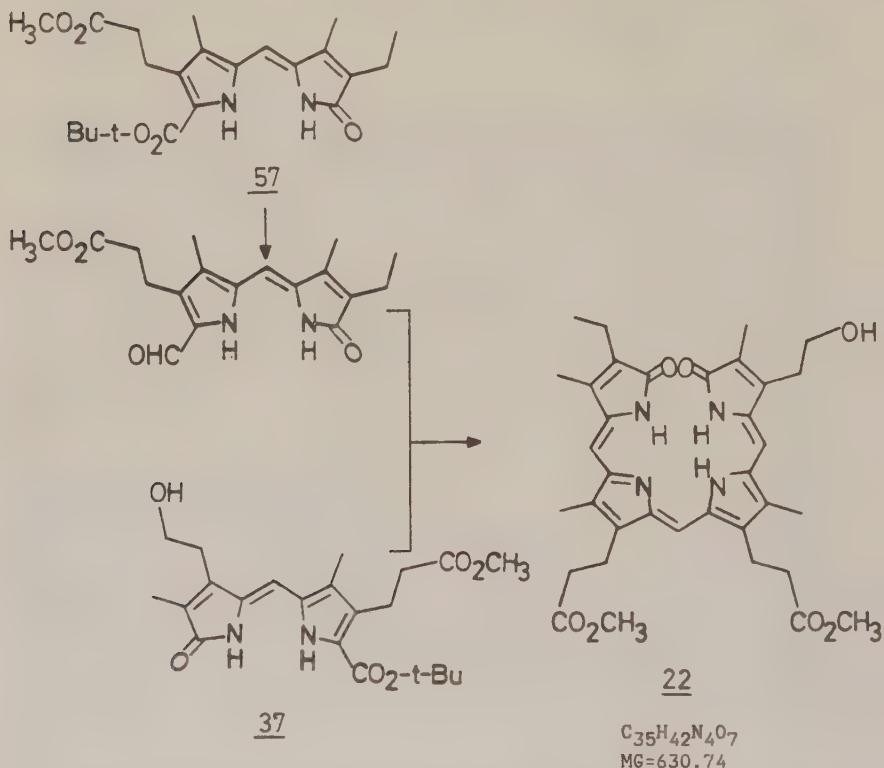
5.70 (ABxBX, J(3²_A, 3²_B)=1.4, J(3¹_X, 3²_B)=18.5, 1H, H_BC(3²))5.65 (ABxAX, J(3²_A, 3²_B)=1.4, J(3¹_X, 3²_A)=11.5, 1H, H_AC(3²))3.99-3.91 (br, 2H, H₂C(8²))3.71, 3.64 (je s, 6H, H₃CO(13⁴), H₃CO(17⁴))2.98-2.92 (br, 2H, H₂C(8¹))2.90 (t, J(17¹, 17²)=7.6, 2H, H₂C(17¹))2.76 (t, J(13¹, 13²)=7.6, 2H, H₂C(13¹))

2.63 (t, J(17¹,17²)=7.6, 2H, H₂C(17²))2.49 (t, J(13¹,13²)=7.6, 2H, H₂C(13²))2.25 (s, 3H, H₃C(12¹))2.09 (s, 3H, H₃C(2¹))2.04 (s, 3H, H₃C(7¹))1.98 (s, 3H, H₃C(18¹))NOE-Experimente:

1	2	6.63	6.02	6.00	5.70	5.65	3.94	2.95	2.90	2.76	2.25	2.09	2.04	1.98
7.30											3.3			
6.63			7.3			1.4								
6.02		4.2											2.9	
6.00							1.3		3.3	0.8				
5.70												1.8		
5.65		3.0												
3.94				2.3				2.6						
2.95							1.4						1.1	
2.90				6.3										+
2.76				1.0							+			
2.63				2.2					7.9					
2.49										2.1	+			
2.25										1.0				
2.09						1.3								
2.04			6.5					2.1						
1.98									3.7					

FAB-MS(2-Nitrophenyl-octylether):610, M⁺

4.5.2 Darstellung von (Z,Z,Z)-8,12-bis-[2-(Methoxycarbonyl)-ethyl]-18-ethyl-3-(2-hydroxyethyl)-1,19,22,24-tetrahydro-2,7,13,17-tetramethyl-21H-bilin-1,19-dion (Turboverdin) (22)

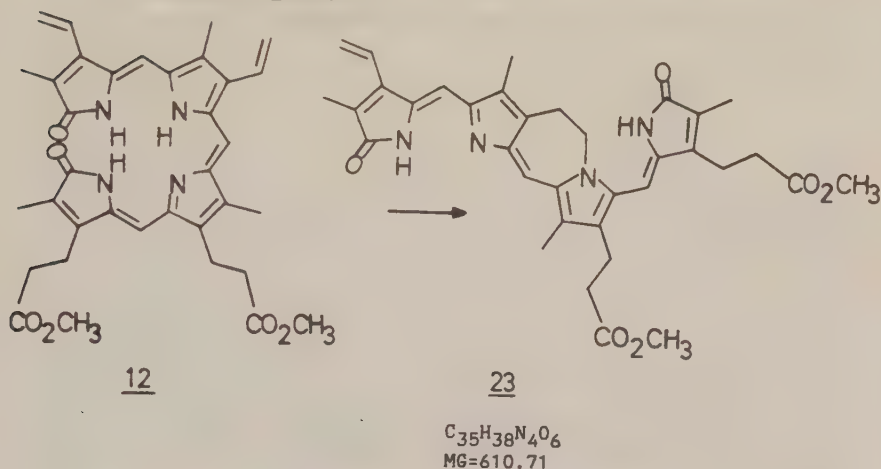


9 mg 57 (4.6.18) wurden formyliert wie unter 4.6.15 beschrieben. 7 mg 37 (4.6.7) wurden in 3 ml TFA gelöst und nach 15 Minuten bei RT mit einer Lösung von 6 mg des formylierten Dipyrinons in 1 ml TFA versetzt. Nach 30 minütigem Rühren gab man 2 ml Methanol zu, rührte für weitere 15 Minuten und versetzte dann mit Methylenchlorid/Wasser. Die organische Phase wurde mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 2x mit Wasser gewaschen. Nach Abziehen des LM am RV erfolgte Reinigung durch PSC an Kieselgel (Methylenchlorid/Essigsäure-ethylester = 1:1). Ausbeute: 8 mg (76 %)

Spektroskopische Daten:

Die spektroskopischen Daten stimmen mit dem natürlichen Farbstoff (vgl. 4.5.1) überein.

4.5.3 Darstellung von (Z,E,Z)-13,17-bis-[2-(Methoxycarbonyl)-ethyl]-8,23-ethano-3-ethenyl-1,19,23,24-tetrahydro-2,7,12,18-tetramethyl-21H-bilin-1,19-dion (Neobiliverdin-dimethylester IXδ = NBV-dme IXδ)(23)[14]



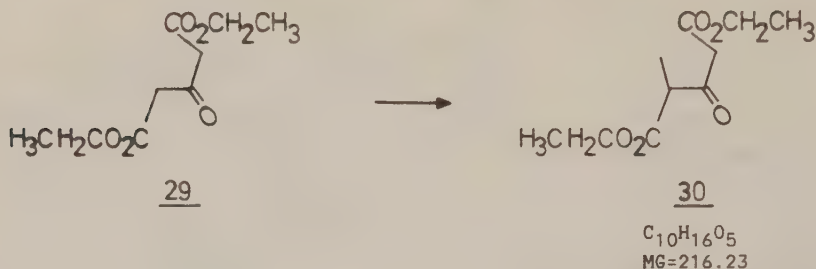
15 mg BVdme IXδ (12) wurden in 5 ml Methanol gelöst und unter Stickstoff in einem verschlossenen Pyrexglas 6 h auf 100°C erhitzt. Das Produkt wurde von noch vorhandenem Edukt durch DC an Kieselgel (ohne Fluoreszenzindikator) abgetrennt (Methylenchlorid/Essigsäure-ethylester = 1:1).

Spektroskopische Daten:

Die spektroskopischen Daten stimmen mit dem aus Turbo cornutus isolierten Produkt 23 überein (vgl. 4.5.1).

4.6 Synthese von (Z,Z,Z)-(2RS,3SR)-8,12-bis-[2-(Methoxycarbonyl)-ethyl] -3-ethenyl-18-ethyl-1,2,3,19,22,24-hexahydro-2,7,13,17-tetramethyl-21H-bilin-1,19-dion (rac. 61)

4.6.1 rac. 2-Methyl-3-oxo-glutarsäure-diethylester (30)



18 g Magnesium wurden nach Zugabe von 1.0 g Iod in 500 ml Ethanol unter Rückfluß gekocht. Nachdem alles gelöst war, tropfte man dazu langsam 101 g 29 und nach 1 h 30 ml Methyljodid. Es wurde noch 10 h unter Rückfluß gekocht, das LM am RV abgezogen und der Rückstand mit halbkonzentrierter Salzsäure angesäuert. Das Produkt wurde mit Methylenchlorid extrahiert, die organische Phase 2x mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 2x mit Wasser gewaschen, durch Filtration über Watte getrocknet und das LM am RV abgezogen. Reinigung erfolgte durch Destillation über eine 15 cm Vigreux-Kolonne im Wasserstrahlvakuum, das Produkt destillierte bei 136-138°C.

Ausbeute: 80.4 g (74 %)

IR(CHCl₃):

3020w, 2980w, 2937w, 2900w, 1732s, 1715s, 1650w, 1450w, 1365w, 1320m, 1215br, 1150w, 1020w, 890w, 855w, 725w, 670w

¹H-NMR(CDCl₃):

4.198, 4.197 (je q, J(6,7)=J(6',7')=7.1, 4H, H₂C(6), H₂C(6'))

3.71 (q, J(2,2¹)=7.1, 1H, HC(2))

3.65, 3.57 (je AB, J(4_A,4_B)=16.0, 2H, H_AC(4), H_BC(4))

1.37 (d, J(2,2¹)=7.1, 3H, H₃C(2¹))

1.28 (t, J(6,7)=J(6',7')=7.1, 6H, H₃C(7) + H₃C(7'))

Weitere Signale mit geringer Intensität, die auch nach einer Destillation mit einer Fischer-Spaltrohrapparatur noch enthalten waren und wahrscheinlich zurückzuführen sind auf Enolisierung:

5.13 (d), 5.10 (s), 4.2 (m), 3.85 (q), 3.74 (m), 3.61 (s), 3.54 (s), 3.35 (s), 3.26 (q), 1.78 (s), 1.66 (s), 1.40 (s), 1.37 (m), 1.28 (m)

^{13}C -NMR(CDCl₃):

197.7 (s, C(3))

169.1, 166.1 (je s, C(1), C(5))

60.8, 60.6 (je t, C(6), C(6'))

52.0 (d, C(2))

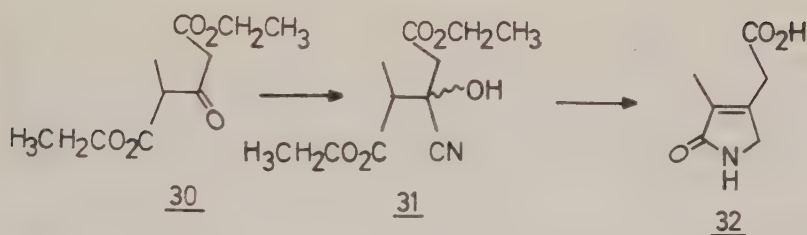
47.3 (t, C(4))

13.4 (q, C(7) + C(7'))

11.7 (q, C(2'))

EI-MS:216 (6), M⁺

185 (8)

171 (37), M⁺-OCH₂CH₃129 (32), M⁺-CH₂CO₂CH₂CH₃115 (47), M⁺-CH(CH₃)-CO₂CH₂CH₃102 (84), CH₃CH₂O₂C-CH-CH₃⁺+187 (22), CH₃CH₂O₂C-CH₂⁺74 (38), CH₃CH₂O₂C⁺+1**4.6.2 4-Carboxymethyl-3-methyl-3-pyrrolin-2-on (32)**

C₇H₉NO₃
 MG=155.15

Zu 99 g **30** gab man unter Eiskühlung und Rühren eine Lösung von 60 g Natriumpyrosulfit in 90 ml Wasser und tropfte dazu langsam eine Lösung von 45 g Natriumcyanid in 75 ml Wasser. Nach 2 h Rühren bei RT versetzte man mit 300 ml Wasser. Die organische Phase wurde abgetrennt und 1x mit 50 ml konz. Salzsäure gewaschen. Das so erhaltenen Cyanhydrin **31** wurde in 1.5 l Acetanhydrid gelöst und mit 10 g Raney-Nickel versetzt, das vorher 3x mit Methanol und 2x mit Eisessig gewaschen worden war. Im Autoklaven wurde zunächst 2 h bei 100°C und 70 at. hydriert, dann ließ man den Katalysator absitzen und erhitzte für 6 h auf 180°C. Der Katalysator wurde abfiltriert, das LM im Vakuum abgezogen und der Rückstand mit 300 ml 2 N Schwefelsäure 2 h unter Rückfluß gekocht. Nach Filtration wurde die Lösung mit Natriumcarbonat auf pH 3 gebracht, mit Aktivkohle aufgeköcht, filtriert und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde mit insgesamt 1 l heißem Isopropanol

extrahiert. Nach Abziehen des LM am RV erhielt man ein Öl, aus dem nach Zugabe von Methylenchlorid bei -20°C Kristalle erhalten werden konnten. Wenn keine Kristallisation erfolgte, wurde das Öl an Kieselgel (Säule) mit Methylenchlorid als FM chromatographiert. Die Fraktionen, die Produkt enthielten (ADC- oder NMR-Kontrolle), wurden dann zur Kristallisation gebracht.

Ausbeute: 3.2 g (5 %)

Smp.: $171-172^{\circ}\text{C}$

IR(KBr):

3310m, 2910w, 2780w, 1930w, 1703s, 1690s, 1665m, 1615m, 1440w, 1425m, 1395w, 1385w, 1360w, 1330w, 1285m, 1270m, 1205w, 1125w, 1070w, 1045w, 1020w, 937w, 895w, 798w, 760w, 753w, 680w, 650w, 625w, 590w, 560w, 540w, 500w, 447w, 340w, 320w

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD):

3.98 (q, $J(2^1,4)=1.8$, 2H, $\text{H}_2\text{C}(4)$)

3.45 (s, 2H, $\text{H}_2\text{C}(3^1)$)

1.79 (t, $J(2^1,4)=1.8$, 3H, $\text{H}_3\text{C}(2^1)$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (D_6 -DMSO):

173.7 (s, C(1))

170.8 (s, C(3²))

145.2 (s, C(3))

129.9 (s, C(2))

48.0 (t, C(4))

33.2 (t, C(3¹))

8.2 (q, C(2¹))

EI-MS:

155 (85), M^+

110 (100), $\text{M}^+-\text{CO}_2\text{H}$

96 (44), $\text{M}^+-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$

82 (54), $\text{M}^+-\text{CO}_2\text{H}-\text{CH}_2\text{N}$

Elementaranalyse:

ber. C 54.19 H 5.85 N 9.03 %

gef. C 54.11 H 5.90 N 9.09 %

4.6.3 4-Methoxycarbonylmethyl-3-methyl-3-pyrrolin-2-on (33)

$C_8H_{11}NO_3$
MG=169.18

2.8 g 32 wurden mit 50 ml Methanol + 4 % Schwefelsäure 1 h bei RT verestert. Nach Zugabe von 100 ml Methylenchlorid wurde mit 100 ml Wasser versetzt. Die wäßrige Phase wurde 4x mit 20 ml Methylenchlorid rückextrahiert, die vereinigten Methylenchlorid-Phasen 1x mit Wasser gewaschen, durch Filtration über Watte getrocknet und das LM am RV abgezogen. Das Produkt wurde aus Essigsäure-ethylester umkristallisiert. Ausbeute: 2.78 g (91 %)

Smp.: 110°C

IR(KBr):

3200s, 3070w, 2950w, 2910w, 2842w, 2820w, 1747s, 1685s, 1665s, 1440m, 1405w, 1395w, 1365w, 1340w, 1320m, 1195s, 1178s, 1160m, 1085w, 1055w, 993m, 920w, 890w, 767m, 758m, 740w, 710w, 690w, 605w, 580w, 377w, 295w

1H -NMR($CDCl_3$):

8.01-7.91 (s, 1H, NH)
3.98 (q, $J(2^1,4)=1.8$, 2H, $H_2C(4)$)
3.72 (s, 3H, $H_3C(3^3)$)
3.42 (s, 2H, $H_2C(3^1)$)
1.84 (t, $J(2^1,4)=1.8$, 3H, $H_3C(2^1)$)

^{13}C -NMR($CDCl_3$):

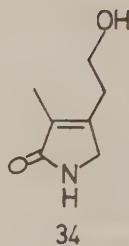
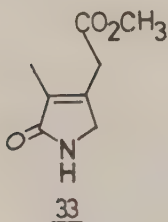
175.7 (s, C(1))
169.7 (s, C(3²))
144.2 (s, C(3))
131.7 (s, C(2))
52.2 (q, C(3³))
49.1 (t, C(4))
33.5 (t, C(3¹))
8.5 (q, C(2¹))

EI-MS:169 (31), M^+ 110 (100), $M^+ - CO_2CH_3$ 96 (25), $M^+ - CH_2CO_2CH_3$ 82 (43), $M^+ - CO_2H - CH_2N$ Elementaranalyse:

ber. C 56.80 H 6.55 N 8.28 %

gef. C 56.84 H 6.49 N 8.22 %

4.6.4 4-(2-Hydroxyethyl)-3-methyl-3-pyrrolin-2-on (34)


 $C_7H_{11}NO_2$
 MG=141.17

1.85 g **33** wurden in 70 ml THF gelöst und langsam zu einer Suspension von 1.85 g Lithiumaluminiumhydrid in 40 ml Diethylether getropft. Es wurde 1 h bei RT gerührt, dann unter Eiskühlung mit 2 N Schwefelsäure angesäuert und mit Natriumcarbonat neutralisiert. Nach Filtration wurde das Filtrat am RV zur Trockene gebracht und das Produkt aus Isopropanol umkristallisiert. Aus dem Rückstand der Filtration ließ sich durch Extraktion mit Methylenchlorid im Soxhlet noch Produkt gewinnen, das ebenfalls umkristallisiert wurde.

Ausbeute: 1.21 g (78 %)

Smp.: 115-116°C

IR(KBr):

3220s, 3180s, 2940m, 2915w, 2893w, 2880w, 2400w, 2360w, 1675s, 1660s, 1450m, 1420w, 1392w, 1370w, 1355w, 1335w, 1315w, 1240w, 1180w, 1148w, 1100w, 1075w, 1050m, 990w, 972w, 930w, 870w, 845w, 775m, 722m, 670w, 595w, 558w, 505w, 445w, 340w

 1H -NMR(CDCl₃+CD₃OD):

3.94 (q, $J(2^1, 4) = 1.8$, 2H, $H_2C(4)$)
 3.73 (t, $J(3^1, 3^2) = 6.4$, 2H, $H_2C(3^2)$)
 2.64 (t, $J(3^1, 3^2) = 6.4$, 2H, $H_2C(3^1)$)
 1.80 (t, $J(2^1, 4) = 1.8$, 3H, $H_3C(2^1)$)

^{13}C -NMR: ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$):

177.2 (s, C(1))

152.7 (s, C(3))

129.6 (s, C(2))

60.7 (t, C(3²))

49.8 (t, C(4))

31.7 (t, C(3¹))

8.5 (q, C(2¹))

EI-MS:

141 (27), M^+

123 (60), $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$

110 (100), $\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{OH}$

96 (46), $\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$

82 (48), $\text{M}^+ - \text{CO}_2 - \text{CH}_2\text{N}$

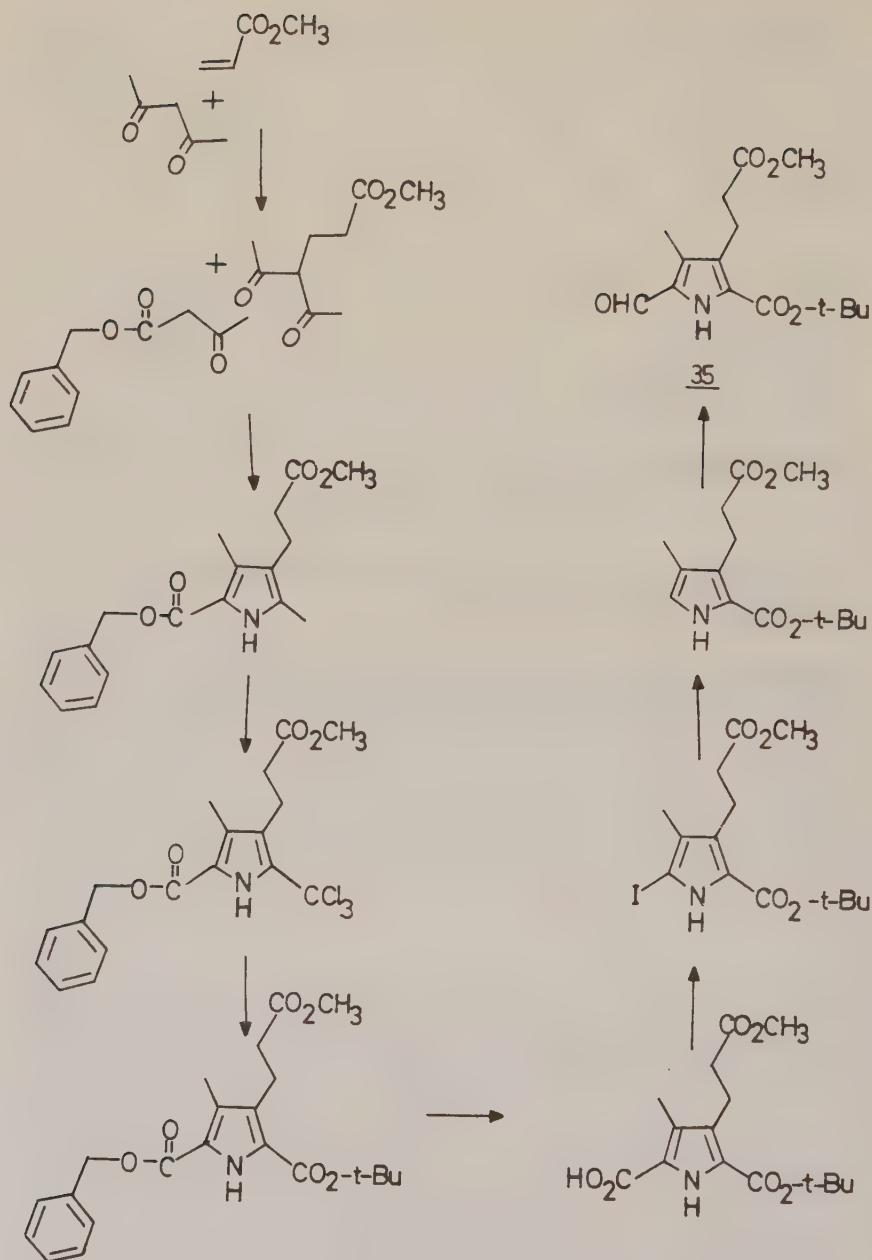
Elementaranalyse:

ber. C 59.51 H 7.85 N 9.92

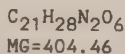
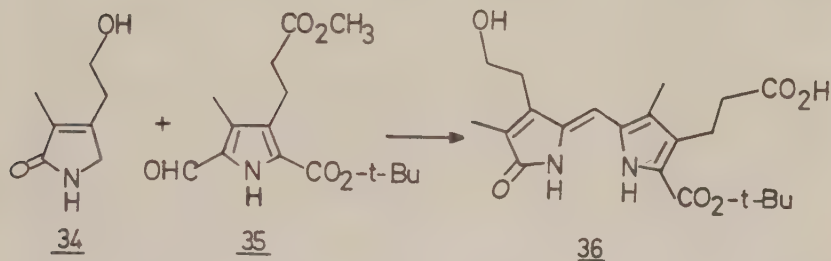
gef. C 59.41 H 7.95 N 10.02

4.6.5 2-Formyl-4-[2-(methoxycarbonyl)-ethyl]-3-methyl-1H-pyrrol-5-carbonsäure-tert.-butylester (35)

Verbindung 35 wurde nach bekannten Literaturverfahren [118-123] nach der auf dem folgenden Schema angegebenen Weise dargestellt.



4.6.6 (Z)-9-tert.-Butoxycarbonyl-8-(2-carboxyethyl)-2,7-dimethyl-3-(2-hydroxyethyl)-10H-dipyrryn-1-on (36)



1.0 g 34 und 1.8 g 35 wurden in 5 ml Methanol gelöst, mit 30 ml 4 N Kaliumhydroxid versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Nach Ansäuerung mit Schwefeldioxid wurde der gelbe Niederschlag abgenutscht, mit Wasser gewaschen, getrocknet und aus Methanol umkristallisiert.
Ausbeute: 1.7 g (59 %)

Smp.: 222-223°C

UV/VIS:

CH₃OH 402(sh), 386(4.47), 280(sh), 260(4.31), 255(sh)
CH₃OH+(CH₃CO₂)₂Zn 439(4.41), 420(4.42), 272(sh), 265(4.29)

IR(KBr):

3450br, 3300m, 2960w, 1690s, 1658s, 1445w, 1385w, 1360w, 1290w, 1275m, 1255w, 1210w, 1165w, 1135m, 1115w, 1055w, 980w, 850w, 805w, 775w, 760w, 725w, 668w, 597w

¹H-NMR(CDCl₃+CD₃OD):

6.11 (s, 1H, HC(5))
3.73 (t, J(3¹,3²)=7.1, 2H, H₂C(3²))
3.03-2.98 (AA'XX', 2H, H₂C(8¹))
2.80 (t, J(3¹,3²)=7.1, 2H, H₂C(3¹))
2.52-2.48 (AA'XX', 2H, H₂C(8²))
2.11 (s, 3H, H₃C(7¹))
1.94 (s, 3H, H₃C(2¹))
1.60 (s, 9H, (H₃C)₃C(9²))

¹³C-NMR(CDCl₃+CD₃OD):

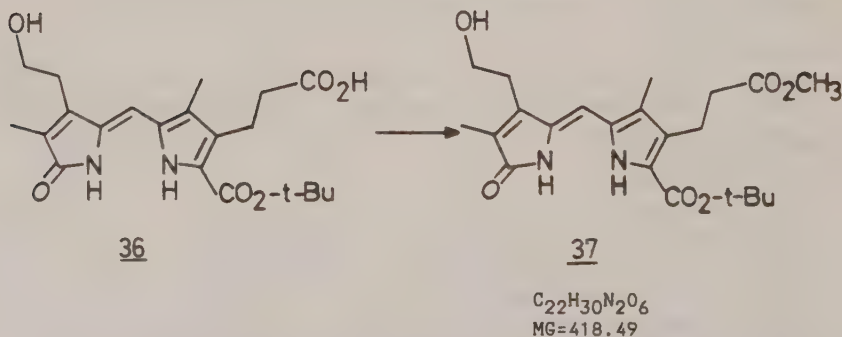
176.7 (s, C(1))
174.8 (s, C(8³))
162.3 (s, C(9¹))
144.2 (s, C(3))

135.7 (s, C(4))
 130.2, 129.3, 128.9 (je s, C(2), C(6), C(8))
 123.7, 123.5 (je s, C(7), C(9))
 99.6 (d, C(5))
 82.2 (s, C(9²))
 62.3 (t, C(3²))
 35.9 (t, C(8²))
 29.0 (t, C(3¹))
 28.7 (q, (H₃C)₃C(9²))
 21.6 (t, C(8¹))
 9.3 (q, C(7¹))
 8.7 (q, C(2¹))

EI-MS:

404 (8), M⁺
 360 (24), M⁺-CO₂
 348 (54), M⁺-H₂C=C(CH₃)₂
 318 (17)
 304 (100), M⁺-CO₂C(CH₃)₃+1
 288 (15)
 273 (15)

4.6.7 (Z)-9-tert.-Butoxycarbonyl-2,7-dimethyl-3-(2-hydroxyethyl)-8-[2-(methoxycarbonyl)-ethyl]-10H-dipyrin-1-on (37)



1.0 g 36 wurden in 50 ml Methanol gelöst und nach Zugabe einer Lösung von 0.51 g N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid sowie 0.02 g 4-Dimethylaminopyridin in 10 ml Methylenchlorid bei RT 3 h gerührt. Nach Versetzen mit Methylenchlorid wurde 1x mit Wasser, 3x mit 5 % Essigsäure und wieder 3x mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde durch Filtration über Watte getrocknet und das LM am RV abgezogen. Das Produkt wurde aus Isopropanol umkristallisiert.
 Ausbeute: 0.88 g (84 %)

Smp.: 176-178°C

UV/VIS:

CH_3OH 401(sh), 384(4.47), 280(sh), 259(4.36), 253(sh)
 $\text{CH}_3\text{OH}+(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Zn}$ 438(4.36), 418(4.40), 271(sh), 265(4.34)

IR(KBr):

3320m, 3180br, 2970w, 2920m, 2850w, 1733m, 1685s, 1667s, 1550w, 1440m,
 1390w, 1360m, 1270m, 1250m, 1155m, 1130m, 1110w, 1050w, 965w, 885w,
 845w, 770w, 755w, 720w, 700w, 675w, 580w

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$:

9.72-9.66 (s, 1H, NH)
 8.96-8.91 (s, 1H, NH)
 5.83 (s, 1H, HC(5))
 4.11-3.90 (s, 1H, OH)
 4.06 (t, $J(3^1, 3^2)=5.4$, 2H, $\text{H}_2\text{C}(3^2)$)
 3.68 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(8^4)$)
 2.92-2.88 (AA'XX', 2H, $\text{H}_2\text{C}(8^1)$)
 2.76 (t, $J(3^1, 3^2)=5.4$, 2H, $\text{H}_2\text{C}(3^1)$)
 2.45-2.40 (AA'XX', 2H, $\text{H}_2\text{C}(8^2)$)
 1.94 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(7^1)$)
 1.84 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(2^1)$)
 1.57 (s, 9H, $(\text{H}_3\text{C})_3\text{C}(9^2)$)

$^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD})$:

173.5, 173.3 (je s, C(1), C(8³))
 161.5 (s, C(9¹))
 142.8 (s, C(3))
 134.6 (s, C(4))
 129.0, 128.9, 128.3 (je s, C(2), C(6), C(8))
 122.8, 122.4 (je s, C(7), C(9))
 97.6 (d, C(5))
 81.6 (s, C(9²))
 61.7 (t, C(3²))
 51.5 (q, C(8⁴))
 35.0 (t, C(8²))
 28.5 (t, C(3¹))
 28.4 (q, $(\text{H}_3\text{C})_3\text{C}(9^2)$)
 20.9 (t, C(8¹))
 9.0 (q, C(7¹))
 8.5 (q, C(2¹))

EI-MS:

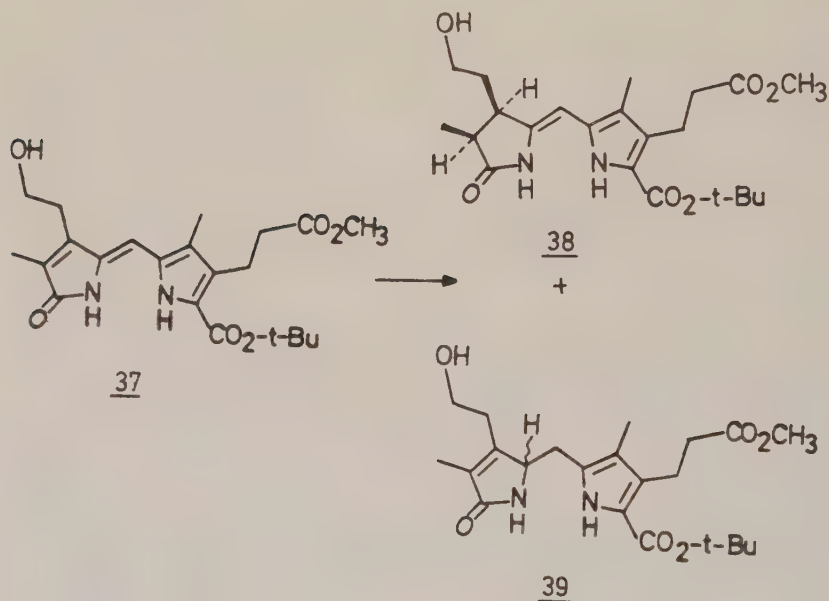
418 (78), M^+
 362 (100), $\text{M}^+-\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$
 345 (12), $\text{M}^+-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ und/oder $\text{M}^+-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$
 331 (38), $\text{M}^+-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$

318 (56), $M^+ - O_2C(CH_3)_3 + 1$

302 (100)

288 (34)

4.6.8 (Z)-(2RS,3SR)-9-tert.-Butoxycarbonyl-2,3-dihydro-2,7-dimethyl-3-(2-hydroxyethyl)-8-[2-(methoxycarbonyl)-ethyl]-10H-dipyrroin-1-on (rac. 38) und (4RS)-9-tert.-Butoxycarbonyl-4,5-dihydro-2,7-dimethyl-3-(2-hydroxyethyl)-8-[2-(methoxycarbonyl)-ethyl]-10H-dipyrroin-1-on (39)



$C_{22}H_{32}N_2O_6$
MG=420.50

100 mg 37 wurden in 12 ml Benzol und 3 ml Methanol gelöst und mit 200 mg Palladium/Calciumcarbonat (5 %) bei RT und Normaldruck hydriert, bis die gelbe Farbe verschwunden war (ca. 6 h). Der Katalysator wurde abfiltriert, das LM am RV abgezogen und der Rückstand durch PSC an Kieselgel (Methylenchlorid/Essigsäure-ethylester/Methanol = 20:20:7) getrennt. Die beiden Hauptbanden wurden eluiert, wobei rac. 38 über 39 chromatographierte.

Ausbeute: rac. 38 52 mg (52 %)

39 26 mg (26 %)

rac. 38:

UV/VIS:

CH_3OH 311(4.28), 248(sh), 229(4.11)

$\text{CH}_3\text{OH} + (\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Zn}$ 356(4.24), 311(3.96), 290(3.95), 280(3.92), 235(4.26)

IR(KBr):

3430br, 3300br, 2970m, 2930m, 2870w, 1715s, 1673s, 1560w, 1490w, 1435m, 1390m, 1365m, 1280m, 1250m, 1167m, 1135m, 1112m, 1055m, 960w, 845w, 775w

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$:

9.34 (s, 1H, NH)

8.66 (s, 1H, NH)

5.38 (d, $J(3,5)=0.8$, 1H, HC(5))

3.84-3.76 (m, 2H, $\text{H}_2\text{C}(3^2)$)

3.67 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(8^4)$)

3.20 (dx dx dx d, $J(3,5)=0.8$, $J(2,3)=8.2$, $J(3,3^1_A)=6.7$, $J(3,3^1_B)=8.1$, 1H, HC(3))

2.99-2.94 (AA'XX', 2H, $\text{H}_2\text{C}(8^1)$)

2.83-2.75 (s, 1H, OH)

2.79 (dxq, $J(2,2^1)=7.4$, $J(2,3)=8.2$, 1H, HC(2))

2.52-2.47 (AA'XX', 2H, $\text{H}_2\text{C}(8^2)$)

1.94 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(7^1)$)

1.85 (AB dx dx dx d, $J(3^1_A, 3^1_B)=14.0$, $J(3, 3^1_A)=6.7$, $J(3^1_A, 3^2_A) \approx J(3^1_B, 3^2_B) \approx 7$, 1H, $\text{H}_A\text{C}(3^1)$)

1.71 (AB dx dx dx d, $J(3^1_A, 3^1_B)=14.0$, $J(3, 3^1_B)=8.1$, $J(3^1_B, 3^2_A) \approx J(3^1_B, 3^2_B) \approx 7$, 1H, $\text{H}_B\text{C}(3^1)$)

1.52 (s, 9H, $(\text{H}_3\text{C})_3\text{C}(9^2)$)

1.16 (d, $J(2,2^1)=7.4$, 3H, $\text{H}_3\text{C}(2^1)$)

$^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)$:

180.7 (s, C(1))

173.7 (s, C(8³))

161.5 (s, C(9¹))

140.6 (s, C(4))

129.1, 128.7 (je s, C(6), C(8))

119.8, 117.9 (je s, C(7), C(9))

92.4 (d, C(5))

80.9 (s, C(9²))

59.9 (t, C(3²))

51.4 (q, C(8⁴))

40.2, 39.6 (je d, C(2)), C(3))

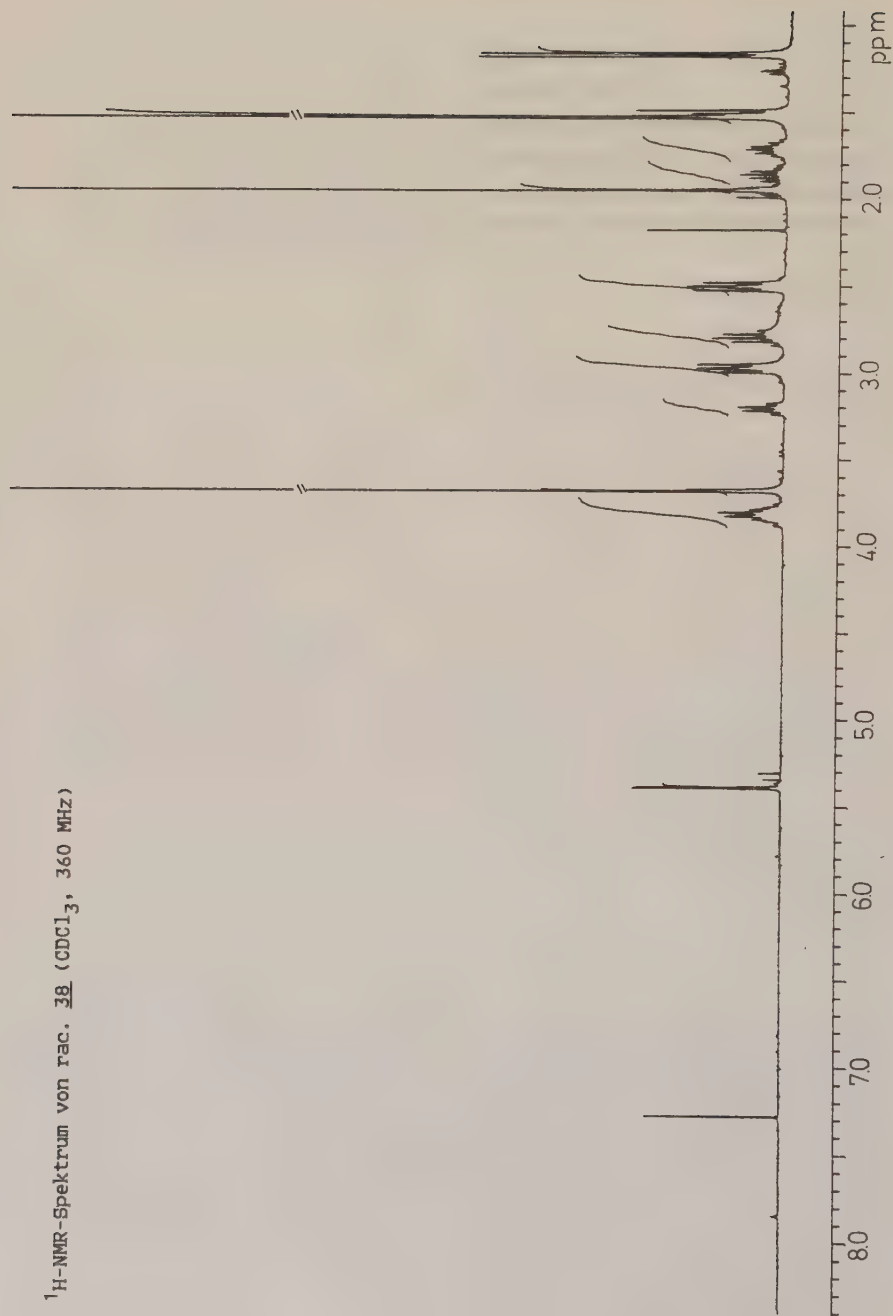
35.1 (t, C(8²))

31.1 (t, C(3¹))

28.4 (q, $(\text{H}_3\text{C})_3\text{C}(9^2)$)

21.0 (t, C(8¹))

^1H -NMR-Spektrum von rac. **38** (CDCl_3 , 360 MHz)



10.6 (q, C(2¹))9.1 (q, C(7¹))EI-MS:420 (5), M⁺364 (7), M⁺-H₂C=C(CH₃)₂

322 (18)

307 (13)

281 (25)

225 (28)

149 (100)

39:UV/VIS:CH₃OH 280(4.26)IR(KBr):

3360br, 2970w, 2920w, 2860w, 1735m, 1675s, 1500w, 1445m, 1390w, 1367m, 1280m, 1250w, 1165m, 1140m, 1110w, 1053w, 960w, 850w, 775w

¹H-NMR(CDCl₃):

9.84-9.77 (s, 1H, NH)

6.85-6.80 (s, 1H, NH)

4.30 (dxd, J(4,5_A)=4.0, J(4,5_B)=11.0, 1H, HC(4))3.87-3.80 (m, 1H, H_AC(3²))3.76-3.69 (m, 1H, H_BC(3²))3.67 (s, 3H, H₃CO(8⁴))3.10 (ABxd, J(5_A,5_B)=14.5, J(4,5_A)=4.0, 1H, H_AC(5))2.97-2.93 (AA'XX', 2H, H₂C(8¹))2.73 (dxdxd, J(3¹_A,3¹_B)=14.4, J(3¹_A,3²_A)=5.6, J(3¹_A,3²_B)=3.6, 1H, H_AC(3¹))2.52-2.42 (m, 4H, H₂C(8²) + H_BC(3¹) + H_BC(5))1.93 (s, 3H, H₃C(7¹))1.78 (s, 3H, H₃C(2¹))1.51 (s, 9H, (H₃C)₃C(9²))¹³C-NMR(CDCl₃):

174.6 (s, C(1))

173.7 (s, C(8³))161.3 (s, C(9¹))

153.8 (s, C(3))

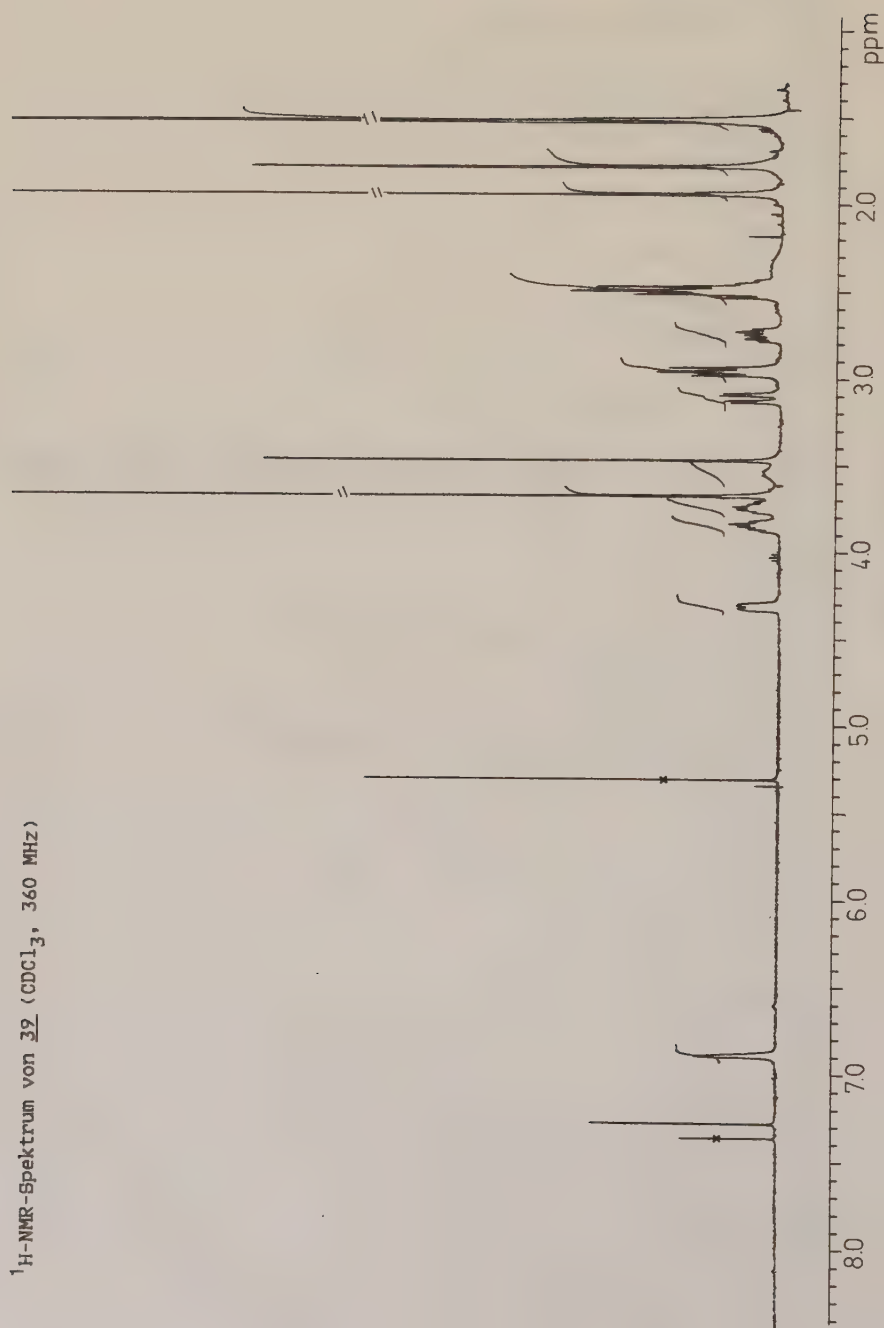
130.2, 129.2, 128.7 (je s, C(2), C(6), C(8))

119.2, 117.4 (je s, C(7), C(9))

80.7 (s, C(9²))60.8 (t, C(3²))

59.4 (d, C(4))

^1H -NMR-Spektrum von 39 (CDCl_3 , 360 MHz)

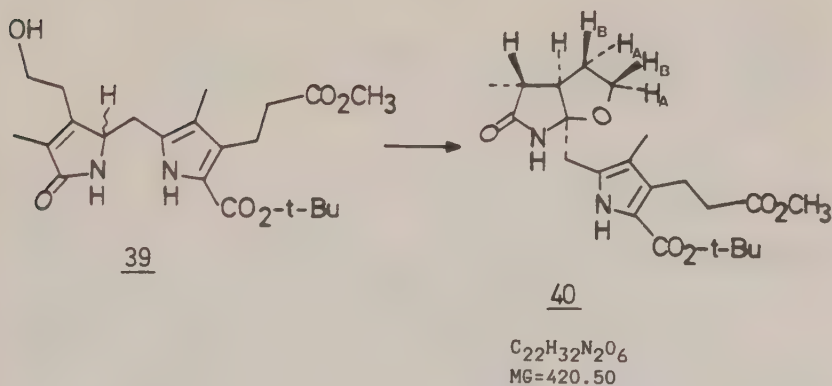


- 51.5 (q, C(8⁴))
 35.2 (t, C(8²))
 30.0, 29.5 (je t, C(3¹), C(5))
 28.4 (q, (H₃C)₃C(9²))
 21.1 (t, C(8¹))
 8.8, 8.5 (je q, C(2¹), C(7¹))

EI-MS:

- 420 (44), M⁺
 280 (70), M⁺-CH₃-C₄H₂NO-C₂H₅O
 224 (100), M⁺-CH₃-C₄H₂NO-C₂H₅O -H₂C=C(CH₃)₂
 192 (33)
 164 (18)
 140 (10), CH₃-C₄H₂NO-C₂H₅O⁺

4.6.9 (2R*S*, 3R*S*, 4R*S*)-9-*tert*.-Butoxycarbonyl-2,3-dihydro-2,7-dimethyl-4,3-epoxyethano-8-[2-(methoxycarbonyl)-ethyl]-10H-dipyrin-1-on (rac. 40)



100 mg 39 wurden in 6 ml 0.5 M Natriummethanolat gelöst und unter Stickstoff 2 h unter Rückfluß gekocht. Das Produkt wurde nach Zugabe von Wasser mit Methylenchlorid extrahiert. Die organische Phase wurde 2x mit Wasser gewaschen, durch Filtration über Watte getrocknet und das LM am RV abgezogen. Reinigung erfolgte durch PSC an Kieselgel (Methylenchlorid/Essigsäure-ethylester/Methanol = 20:20:7), rac. 40 lief etwas schneller als das Edukt.

Ausbeute: 26 mg (26 %)

Unter gleichen Bedingungen wurde aus 50 mg rac. 38 Produkt rac. 40 neben rac. 41 (vgl. 4.6.10) erhalten.

Ausbeute: rac. 40 + rac. 41: 42 mg (84 %)

UV/VIS:CH₃OH 280(4.12)IR(KBr):

3460w, 3300br, 2980m, 2940m, 2870w, 1740s, 1690s, 1580w, 1500w, 1450m,
 1425m, 1395w, 1370m, 1280m, 1255m, 1170m, 1145m, 1115m, 1045m, 1035m,
 990w, 962w, 910w, 850w, 780w, 740w, 620w, 600w, 530w, 470w

¹H-NMR(CDCl₃):

9.23-9.12 (s, 1H, NH)
 6.24-6.19 (s, 1H, NH)
 4.03 (dxd*, J(3²_A, 3²_B)=9.1, J(3¹_A, 3²_A)=7.1, 1H, H_AC(3²))
 3.83 (dxdxd, J(3²_A, 3²_B)=9.1, J(3¹_A, 3²_B)=11.5, J(3¹_B, 3²_B)=5.0, 1H,
 H_BC(3²))
 3.67 (s, 3H, H₃C(8⁴))
 3.03, 2.97 (je AB, J(5_A, 5_B)=14.8, 2H, H_AC(5) + H_BC(5))
 3.00-2.95 (AA'XX', 2H, H₂C(8¹))
 2.53-2.48 (AA'XX', 2H, H₂C(8²))
 2.33 (ABxq, J(2,3)=4.4, J(2,2¹)=7.2, 1H, HC(2))
 2.31 (ABxd**, J(2,3)=4.4, J(3,3¹_A)=8.8, 1H, HC(3))
 1.96 (s, 3H, H₃C(7¹))
 2.00-1.89 (m, 1H, H_AC(3¹))
 1.73 (ABxd***, J(3¹_A, 3¹_B)=12.5, J(3¹_B, 3²_B)=5.0, 1H, H_BC(3¹))
 1.55 (s, 9H, (H₃C)₃C(9²))
 1.17 (d, J(2,2¹)=7.2, 3H, H₃C(2¹))

* keine Kopplung 3¹_B, 3²_A**keine Kopplung 3, 3¹_BNOE-Experimente:

1	2	1.73	1.17
4.03	0.7		
3.83	2.6		
3.03			
2.97		1.1	
2.33			
2.31	6.6	4.5	
1.96	11.3		

¹³C-NMR(CDCl₃):

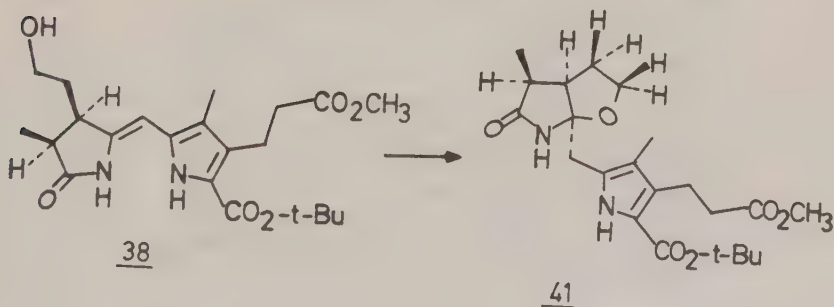
178.7 (s, C(1))
 173.6 (s, C(8³))
 160.9 (s, C(9¹))
 128.1, 126.8 (je s, C(6), C(8))
 119.6, 118.0 (je s, C(7), C(9))
 97.7 (s, C(4))
 80.7 (s, C(9²))

- 66.8 (t, C(3²))
 51.4 (q, C(8⁴))
 50.1 (d, C(3))
 43.4 (d, C(2))
 35.8, 28.5 (je t, C(3¹), C(5))
 35.2 (t, C(8²))
 33.5 (q, (H₃C)₃C(9²))
 20.9 (t, C(8¹))
 17.5 (q, C(2¹))
 8.9 (q, C(7¹))

FI-MS:

- 420 (11), M⁺
 347 (14), M⁺-OC(CH₃)₃
 305 (20)
 289 (27)
 281 (100), M⁺-H₃C-C₄H₃NO-C₂H₄O+1
 254 (8)
 225 (100), M⁺-H₃C-C₄H₃NO-C₂H₄O-HC=C(CH₃)₂
 140 (100), H₃C-C₄H₃NO-C₂H₄O

4.6.10 (2SR,3RS,4RS)-9-tert.-Butoxycarbonyl-2,3-dihydro-2,7-dimethyl-4,3-epoxyethano- 8-[2-(methoxycarbonyl)-ethyl] -10H-dipyrin-1-on (rac. 41)



20 mg rac. 38 wurden in 2 ml Chloroform gelöst, das zuvor gegen 4 N Salzsäure geschüttelt worden war. Nach 2 h bei RT wurde 2x mit Wasser gewaschen, über Watte filtriert und das LM am RV abgezogen.
 Ausbeute: 19 mg (95 %)

UV/VIS:CH₃OH

280(412)

IR(KBr):

3420br, 3290br, 2970m, 2930m, 2870w, 1735m, 1685s, 1500w, 1445m, 1420w, 1390w, 1365m, 1277m, 1255m, 1240m, 1165m, 1142w, 1112m, 1050w, 1030w, 960w, 910w, 845w, 775w

 $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$:

9.23-9.17 (s, 1H, NH)

6.17-6.11 (s, 1H, NH)

3.96 (dxdxd, $J(3^1_A, 3^2_A)=4.2$, $J(3^1_B, 3^2_A)=7.2$, $J(3^2_A, 3^2_B)=8.9$, 1H, $\text{H}_A\text{C}(3^2)$)

3.76 (dxdxd, $J(3^1_A, 3^2_B)=6.5$, $J(3^1_B, 3^2_B)=8.9$, $J(3^2_A, 3^2_B)=8.9$, 1H, $\text{H}_B\text{C}(3^2)$)

3.67 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(8^4)$)

3.05 (AB, $J(5_A, 5_B)=14.9$, 1H, $\text{H}_A\text{C}(5)$)

3.01-2.97 (AA'XX', 2H, $\text{H}_2\text{C}(8^1)$)

2.97 (AB, $J(5_A, 5_B)=14.9$, 1H, $\text{H}_B\text{C}(5)$)

2.71 (ABxdxd, $J(2,3)=9.0$, $J(3,3^1_A)=4.4$, $J(3,3^1_B)=9.0$, 1H, $\text{HC}(3)$)

2.66 (ABxq, $J(2,3)=9.0$, $J(2,2^1)=7.0$, 1H, $\text{HC}(2)$)

2.53-2.48 (AA'XX', 2H, $\text{H}_2\text{C}(8^2)$)

1.95 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(7^1)$)

1.95-1.82 (m, 2H, $\text{H}_2\text{C}(3^1)$)

1.55 (s, 9H, $(\text{H}_3\text{C})_3\text{C}(9^2)$)

1.17 (d, $J(2,2^1)=7.0$, 3H, $\text{H}_3\text{C}(2^1)$)

NOE-Experimente:

1	2	3.96	3.76	2.71	2.66	1.95-1.82	1.17
6.17-6.11			1.0				
3.96			21.2			2.1	
3.76	24.1					1.9	
3.05				1.5			
2.97				1.5			
2.71						10.2	
2.66							3.2
1.95-1.82	4.9	3.8		8.4			1.5
1.17				5.5		9.4	

 $^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)$:

177.6 (s, C(1))

173.6 (s, C(8³))

160.9 (s, C(9¹))

128.0, 127.0 (je s, C(6), C(8))

119.5, 118.0 (je s, C(7), C(9))

97.6 (s, C(4))

80.7 (s, C(9²))

67.1 (t, C(3²))

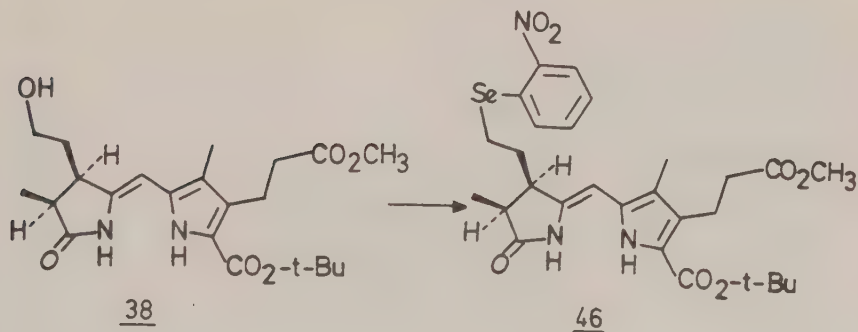
51.4 (q, C(8⁴))

- 46.2 (d, C(3))
 38.1 (d, C(2))
 35.2 (t, C(8²))
 34.5, 27.4 (je t, C(3¹), C(5))
 28.5 (q, (H₃C)₃C(9²))
 21.0 (t, C(8¹))
 11.7 (q, C(2¹))
 8.9 (q, C(7¹))

EI-MS:

- 420 (5), M⁺
 347 (6), M⁺-OC(CH₃)₃
 322 (9)
 305 (8)
 281 (72), M⁺-C₇H₉NO
 254 (17)
 225 (83), M⁺-C₇H₉NO-CH₂-C(CH₃)₃
 140 (100), H₃C-C₄H₃NO-C₂H₄⁺

4.6.11 (Z)-(2*RS*,3*SR*)-9-*tert*.-Butoxycarbonyl-2,3-dihydro-2,7-dimethyl-8-[2-(methoxycarbonyl)-ethyl]-3-[2-(2-nitro-phenylselenyl)-ethyl]-10H-dipyrin-1-on (rac. 46)



C₂₈H₃₅N₃O₇Se
 MG=604.56

Zu einer Lösung von 50 mg rac. 38 und 50 mg 2-Nitrophenyl-selenocyanat in 2 ml THF gab man 63 µl Tributylphosphin (85 %ig). Es wurde 30 Minuten bei RT gerührt und der Reaktionsansatz direkt auf 3 P8C-Platten aufgetragen. Als FM wurde Methylenchlorid/Essigsäure-ethyl-ester = 1:2 verwendet, das Produkt hatte einen R_F-Wert von 0.6.
 Ausbeute: 53 mg (74 %)

UV/VIS:CH₃OH 382(3.58), 313(4.26), 251(4.31), 230(4.27)CH₃OH+(CH₃CO₂)₂Zn 360(4.35), 314(3.87), 255(sh), 237(4.45)IR(KBr):

3300br, 2975m, 2930m, 2870w, 1720s, 1672s, 1590w, 1565w, 1510m, 1440m, 1390w, 1365m, 1330m, 1300m, 1275m, 1250m, 1167m, 1135m, 1050w, 1040w, 980w, 960w, 850w, 780w, 730m, 700w, 648w

¹H-NMR(CDCl₃):

9.10-9.02 (s, 1H, NH)

8.63-8.53 (s, 1H, NH)

8.30 (dxd, J(3⁵,3⁶)=8.4, J(3⁵,3⁷)=1.2, 1H, HC(3⁵))7.53 (ABxdxd, J(3⁷,3⁸)=8.0, J(3⁶,3⁷)=6.4, J(3⁵,3⁷)=1.2, 1H, HC(3⁷))7.49 (ABxd, J(3⁷,3⁸)=8.0, J(3⁶,3⁸)=2.0, 1H, HC(3⁸))7.34 (dxdxd, J(3⁵,3⁶)=8.4, J(3⁶,3⁷)=6.4, J(3⁶,3⁸)=2.0, 1H, HC(3⁶))

5.42 (d, J(3,5)=0.9, 1H, HC(5))

3.67 (s, 3H, H₃CO(8⁴))3.21 (dxdxdxd, J(3,5)=0.9, J(2,3)=8.2, J(3,3¹_A)=6.3, J(3,3¹_B)=8.2, 1H, HC(3))3.09-2.98 (m, 2H, H₂C(3²))3.00-2.95 (AA'XX', 2H, H₂C(8¹))2.89 (dxq, J(2,2¹)=7.4, J(2,3)=8.2, 1H, HC(2))2.53-2.48 (AA'XX', 2H, H₂C(8²))2.11-1.88 (m, 2H, H₂C(3¹))1.93 (s, 3H, H₃C(7¹))1.53 (s, 9H, (H₃C)₃C(9²))1.21 (d, J(2,2¹)=7.4, 3H, H₃C(2¹))NOE-Experimente:

1 \ 2	3.21	2.89	1.21
5.42	4.5		
3.21		4.8	
2.89	7.2		4.2
2.11-1.88	2.6		
1.21	1.0	5.6	

¹³C-NMR(CDCl₃):

180.4 (s, C(1))

173.5 (s, C(8³))161.1 (s, C(9¹))147.0, 132.7 (je s, C(3³), C(3⁴))

139.2 (s, C(4))

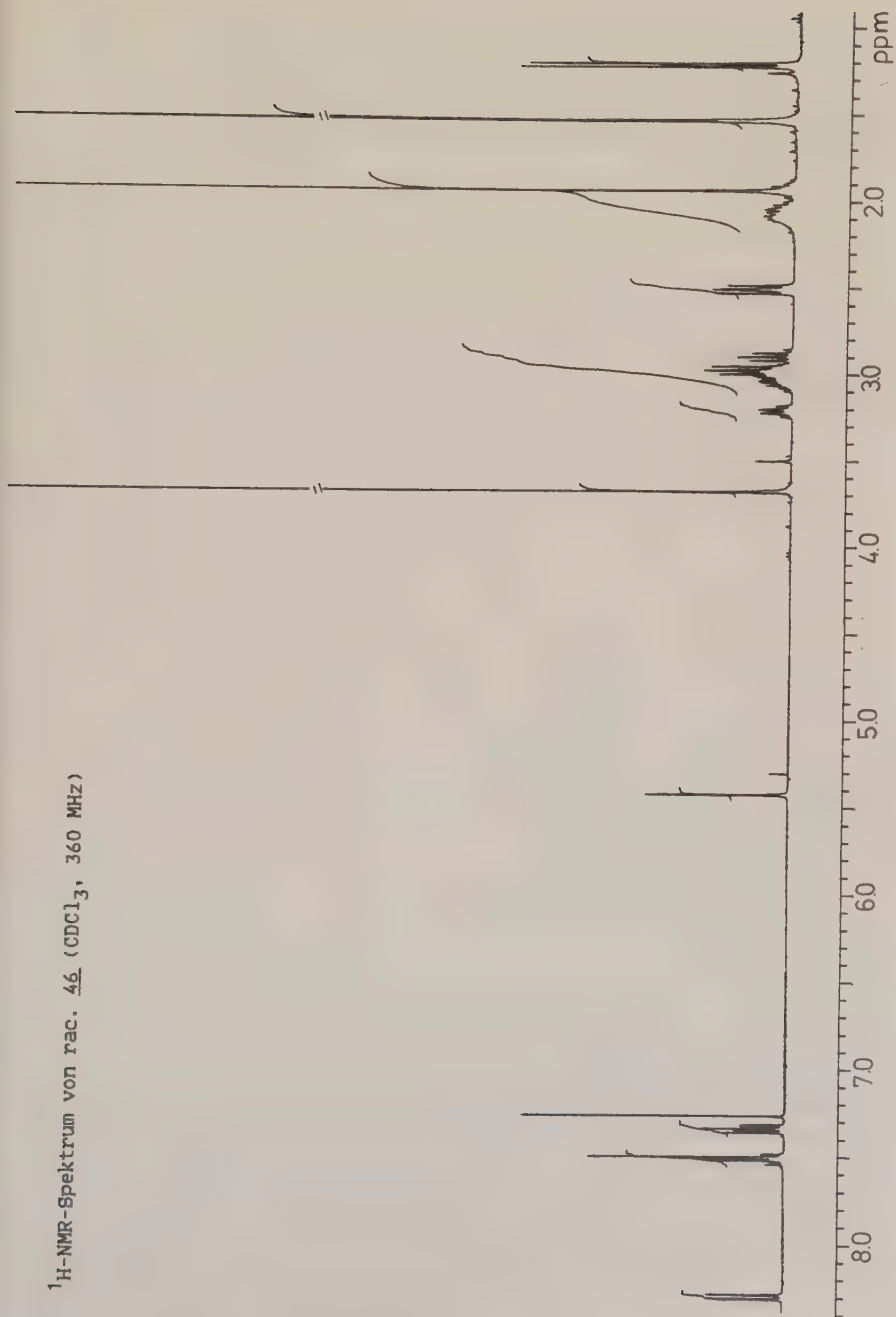
133.7, 129.0, 126.4, 125.6 (je d, C(3⁵), C(3⁶), C(3⁷), C(3⁸))

128.8, 127.9 (je s, C(6), C(8))

120.2, 118.3 (je s, C(7), C(9))

93.1 (d, C(5))

^1H -NMR-Spektrum von rac. 46 (CDCl_3 , 360 MHz)

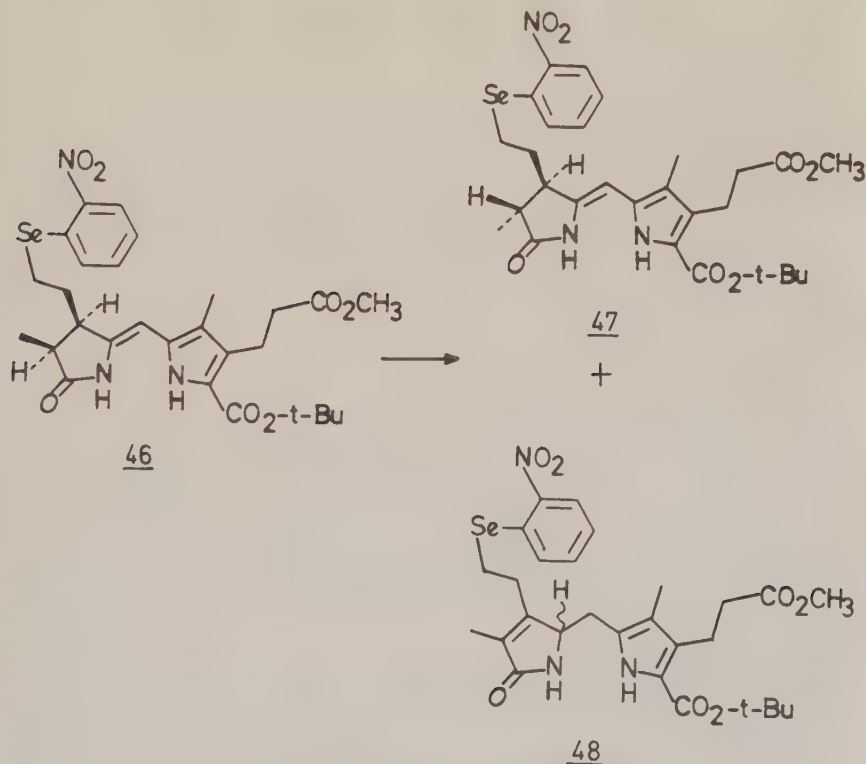


80.8 (s, C(9²))
 51.4 (q, C(8⁴))
 43.8 (d, C(3))
 39.6 (d, C(2))
 35.1 (t, C(8²))
 28.4 (q, (H₃C)₃C(9²))
 27.9 (t, C(3²))
 23.3 (t, C(3¹))
 21.0 (t, C(8¹))
 10.0 (q, C(2¹))
 9.2 (q, C(7¹))

FAB-MS(2-Nitrophenyl-octylether):

605, M⁺+1

- 4.6.12 (Z)-(2RS,3RS)- 9-tert.-Butoxycarbonyl -2,3-dihydro-2,7-dimethyl-8-[2- (methoxycarbonyl)-ethyl] -3-[2-(2-nitro-phenylselenyl)-ethyl]-10H-dipyrin-1-on (rac. 47) und (4RS)-9-tert.-Butoxy-carbonyl-4,5-dihydro-2,7-dimethyl-8-[2-(methoxycarbonyl)-ethyl]-3-[2-(2-nitro-phenylselenyl)-ethyl]-10H-dipyrin-1-on (48)



$\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_7\text{Se}$
 MG=604.56

50 mg rac. 46 wurden mit 2 ml Chloroform, das zuvor gegen 4 N Salzsäure geschüttelt worden war, versetzt und 2 h bei RT stehengelassen. Es wurde mit Wasser neutral gewaschen und durch PSC auf Kieselgel (Methylenchlorid/Essigsäure-ethylester = 2:1) getrennt. Es konnten immer nur 2 Produkte, rac. 47 (R_f wie Edukt) und 48 ($R_f \ll$ Edukt), beobachtet werden, wobei deren Verhältnis sehr unterschiedlich war. Im Extremfall gab es nur ein Produkt, rac. 47 oder 48.

Ausbeute: rac. 47 + 48: 49 mg (98 %)

rac. 47:UV/VIS:CH₃OH 384(3.55), 313(4.26), 251(4.30), 230(4.25)CH₃OH+(CH₃CO₂)₂Zn 361(4.35), 311(3.79), 255(sh), 238(4.44)IR(KBr):3300br, 2980m, 2930m, 2870w, 1740s, 1650s, 1590w, 1565w, 1215m, 1445m,
1395w, 1370m, 1335m, 1305m, 1275m, 1250m, 1170m, 1135m, 1055w, 1040w,
985w, 962w, 910w, 850w, 785w, 730m, 705w, 650w¹H-NMR(CDCl₃):

8.74-8.65 (s, 1H, NH)

8.29 (dxd, J(3⁵,3⁶)=8.3, J(3⁵,3⁷)=1.3, 1H, HC(3⁵))

7.96-7.88 (s, 1H, NH)

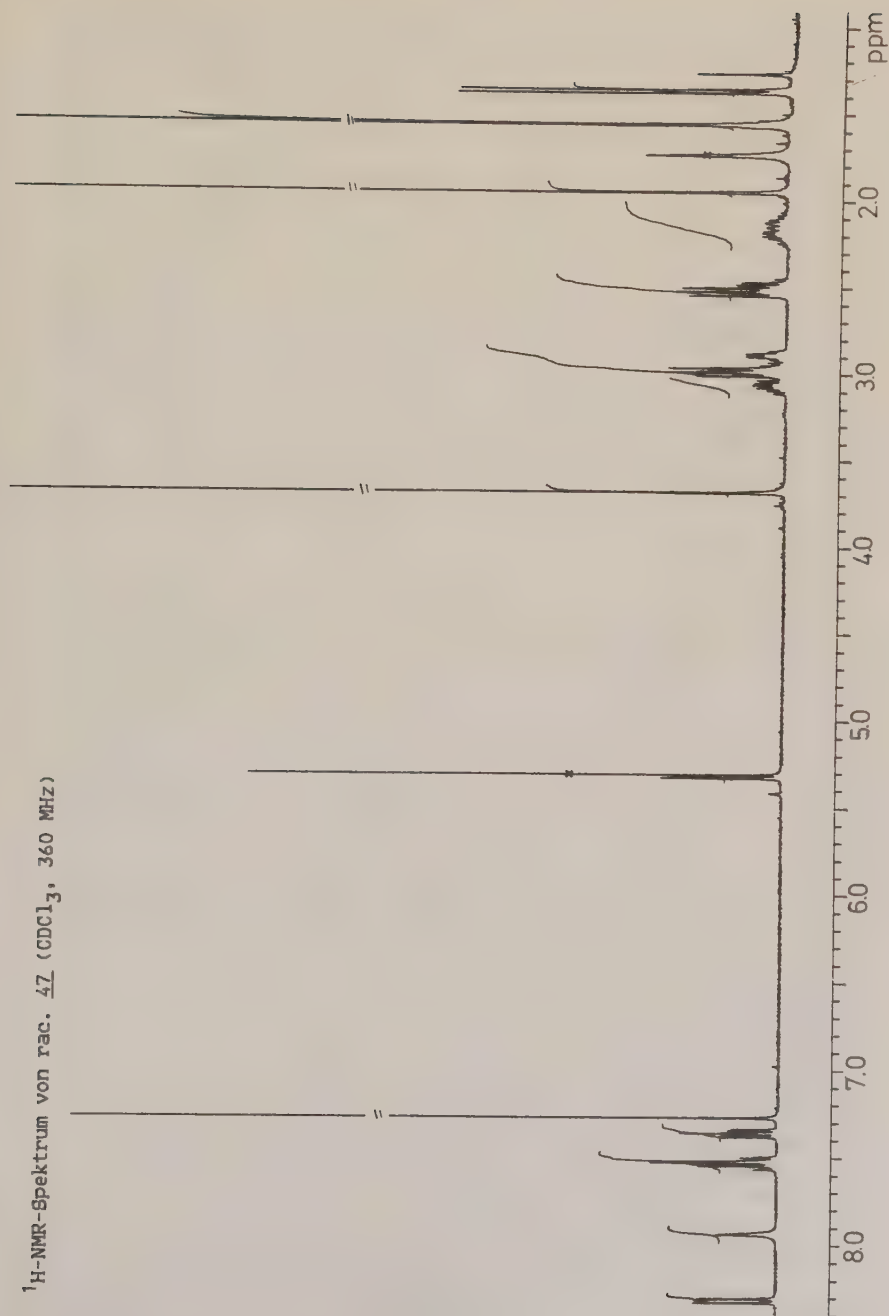
7.53 (ABxdxd, J(3⁷,3⁸)=8.1, J(3⁶,3⁷)=6.6, J(3⁵,3⁷)=1.3, 1H, HC(3⁷))7.49 (ABxd, J(3⁷,3⁸)=8.1, J(3⁶,3⁸)=1.9, 1H, HC(3⁸))7.35 (dxdxd, J(3⁵,3⁶)=8.3, J(3⁶,3⁷)=6.6, J(3⁶,3⁸)=1.9, 1H, HC(3⁶))

5.32 (d, J(3,5)=1.5, HC(5))

3.67 (s, 3H, H₃C(8⁴))3.06 (ABxdxd, J(3²_A,3²_B)=11.6, J(3¹_A,3²_A)=5.7, J(3¹_B,3²_A)=9.4, 1H,
H_AC(3²))3.00-2.96 (AA'XX', 2H, H₂C(8¹))2.96 (ABxdxd, J(3²_A,3²_B)=11.6, J(3¹_A,3²_B)=9.5, J(3¹_B,3²_B)=5.8, 1H,
H_BC(3²))2.89 (dxdxdxd, J(3,5)=1.5, J(2,3)=5.0, J(3,3¹_A)≈J(3,3¹_B)≈5.9, 1H,
HC(3))2.53-2.49 (AA'XX', 2H, H₂C(8²))2.47 (dxq, J(2,3)=5.0, J(2,2¹)=7.3, 1H, HC(2))2.23-2.04 (m, 2H, H₂C(3¹))1.94 (s, 3H, H₃C(7¹))1.55 (s, 9H, (H₃C)₃C(9²))1.35 (d, J(2,2¹)=7.3, 3H, H₃C(2¹))NOE-Experimente:

1 \ 2	5.32	2.89	2.47	1.35
5.32		2.6		
3.06	1.7			
3.00-2.96	2.4			
2.89			0.5	1.4
2.47		1.7		2.2
2.23-2.04	3.2	2.6		
1.94	3.5			
1.35		3.0	1.2	

^1H -NMR-Spektrum von rac. 4Z (CDCl_3 , 360 MHz)



^{13}C -NMR(CDCl₃):

180.1 (s, C(1))
 173.6 (s, C(8³))
 161.1 (s, C(9¹))
 147.1, 132.6 (je s, C(3³), C(3⁴))
 139.8 (s, C(4))
 133.7, 129.0, 126.5, 125.7 (je d, C(3⁵), C(3⁶), C(3⁷), C(3⁸))
 129.0, 128.0 (je s, C(6), C(8))
 120.3, 118.2 (je s, C(7), C(9))
 92.1 (d, C(5))
 80.9 (s, C(9²))
 51.4 (q, C(8⁴))
 47.0 (d, C(3))
 41.4 (d, C(2))
 35.1 (t, C(8²))
 32.6 (t, C(3²))
 28.4 (q, (H₃C)₃C(9²))
 22.2 (t, C(3¹))
 21.0 (t, C(8¹))
 16.9 (q, C(2¹))
 9.3 (q, C(7¹))

FAB-MS(2-Nitrophenyl-octylether):605, M⁺+148:UV/VIS:CH₃OH 389(3.44), 280(4.23), 254(4.19)IR(KBr):

3300br, 2970w, 2920m, 2850w, 1735m, 1675s, 1590w, 1565w, 1510m, 1450m,
 1435m, 1390w, 1365m, 1330m, 1300m, 1275m, 1250m, 1165m, 1135m, 1055w,
 1037w, 960w, 850w, 780w, 730m

 ^1H -NMR(CDCl₃):

9.57-9.50 (s, 1H, NH)
 8.29 (dxd, J(3⁵,3⁶)=8.3, J(3⁵,3⁷)=1.3, 1H, HC(3⁵))
 7.55 (ABxdxd, J(3⁷,3⁸)=8.1, J(3⁶,3⁷)=6.8, J(3⁵,3⁷)=1.3, 1H, HC(3⁷))
 7.50 (ABxd, J(3⁷,3⁸)=8.1, J(3⁶,3⁸)=1.6, 1H, HC(3⁸))
 7.35 (dxdxd, J(3⁵,3⁶)=8.3, J(3⁶,3⁷)=6.8, J(3⁶,3⁸)=1.6, 1H, HC(3⁶))
 6.90-6.82 (s, 1H, NH)
 4.30 (br d*, J(4,5_B)=9.1, 1H, HC(4))
 3.66 (s, 3H, H₃CO(8⁴))
 3.06 (dxd, J(5_A,5_B)=14.6, J(4,5_A)=4.4, 1H, H_AC(5))

*J(4,5_A) nicht aufgelöst, d nur verbreitert

- 3.08-2.98 (m, 3H, $H_A C(3^1) + H_2 C(3^2)$)
 2.97-2.92 (AA'XX', 2H, $H_2 C(8^1)$)
 2.71-2.63 (m, 1H, $H_B C(3^1)$)
 2.55 (dxd, $J(4,5_B)=9.2$, $J(5_A,5_B)=14.6$, 1H, $H_B C(5)$)
 2.50-2.46 (AA'XX', 2H, $H_2 C(8^2)$)
 1.94 (s, 3H, $H_3 C(7^1)$)
 1.80 (s, 3H, $H_3 C(2^1)$)
 1.51 (s, 9H, $(H_3 C)_3 C(9^2)$)

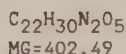
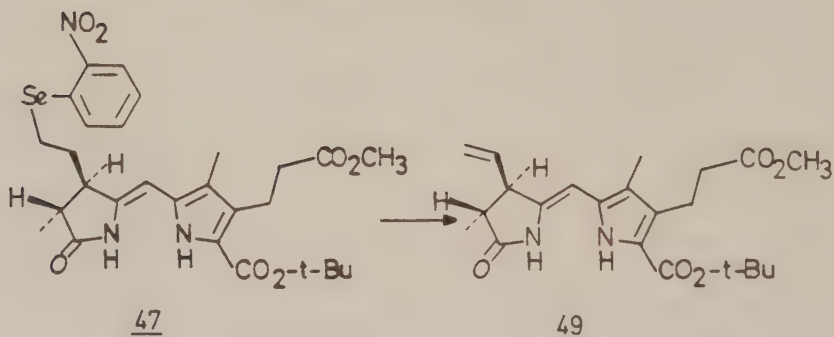
^{13}C -NMR(CDCl₃):

- 174.1 (s, C(1))
 173.6 (s, C(8³))
 161.2 (s, C(9¹))
 153.2 (s, C(3))
 147.2, 132.1 (je s, C(3³), C(3⁴))
 133.7, 129.0, 126.6, 125.9 (je d, C(3⁵), C(3⁶), C(3⁷), C(3⁸))
 130.8, 128.8, 128.3 (je s, C(2), C(6), C(8))
 119.5, 117.4 (je s, C(7), C(9))
 80.8 (s, C(9²))
 58.3 (d, C(4))
 51.4 (q, C(8⁴))
 35.1 (t, C(8²))
 28.5 (q+t, $(H_3 C)_3 C(9^2) + C(5)$ oder C(3²))
 25.7 (t, C(3²) oder C(5))
 23.8 (t, C(3¹))
 21.0 (t, C(8¹))
 9.0, 8.8 (je q, C(2¹), C(7¹))

FAB-MS(2-Nitrophenyl-octylether):

605, $M^+ + 1$

4.6.13 (Z)-(2RS,3RS)-9-tert.-Butoxycarbonyl-3-ethenyl-2,3-dihydro-2,7-dimethyl-8-[2-(methoxycarbonyl)-ethyl]-10H-dipyrryn-1-on (rac. 47)



50 mg rac. 47 wurden in 7.5 ml THF gelöst und mit 0.15 ml 30 % Wasserstoffperoxid versetzt. Nach 2 h Rühren bei RT wurde mit Methylenchlorid verdünnt, 1x mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 2x mit Wasser gewaschen, die organische Phase durch Filtration über Watte getrocknet und das LM am RV abgezogen. Reinigung erfolgte durch PSC an Kieselgel (Methylenchlorid/Essigsäure-ethylester = 2:1), wobei das Produkt höher chromatographierte als das Edukt.

Ausbeute: 29 mg (87 %)

UV/VIS:

CH_3OH 314(4.25), 250(sh), 226(4.16)

$CH_3OH + (CH_3CO_2)_2Zn$ 359(4.27), 310(3.88), 295(3.91), 270(4.03), 236(4.29)

IR(KBr):

3450s, 2980m, 2930m, 2860w, 1740s, 1715s, 1692s, 1672s, 1560w, 1440m, 1420w, 1395w, 1385w, 1365m, 1335m, 1275s, 1250m, 1178m, 1160m, 1135s, 1115m, 1090w, 1055w, 1010w, 995w, 960w, 925w, 875w, 847w, 815w, 800w, 770w, 685w, 630w, 610w, 550w, 520w

$^1H-NMR(CDCl_3)$:

8.95-8.85 (s, 1H, NH)

8.50-8.40 (s, 1H, NH)

5.78 (AXxBXxd, $J(3^1_X, 3^2_A)=10.4$, $J(3^1_X, 3^2_B)=16.3$, $J(3, 3^1_X)=8.6$, 1H, $H_XC(3^1)$)

5.268 (AX*, $J(3^1_X, 3^2_A)=10.4$, 1H, $H_A C(3^2)$)

5.260 (BX*, $J(3^1_X, 3^2_B)=16.3$, 1H, $H_B C(3^2)$)

*Die AB-Kopplung konnte nicht bestimmt werden.

- 5.256 (d, $J(3,5)=1.8$, 1H, HC(5))
 3.67 (s, 3H, $H_3C(8^4)$)
 3.22 (dxdd, $J(3,5)=1.8$, $J(2,3)=J(3,3^1)=8.6$, 1H, HC(3))
 3.00-2.95 (AA'XX', 2H, $H_2C(8^1)$)
 2.53-2.48 (AA'XX', 2H, $H_2C(8^2)$)
 2.50 (dxq, $J(2,3)=8.6$, $J(2,2^1)=7.2$, 1H, HC(2))
 1.94 (s, 3H, $H_3C(7^1)$)
 1.53 (s, 9H, $(H_3C)_3C(9^2)$)
 1.27 (d, $J(2,2^1)=7.2$, 3H, $H_3C(2^1)$)

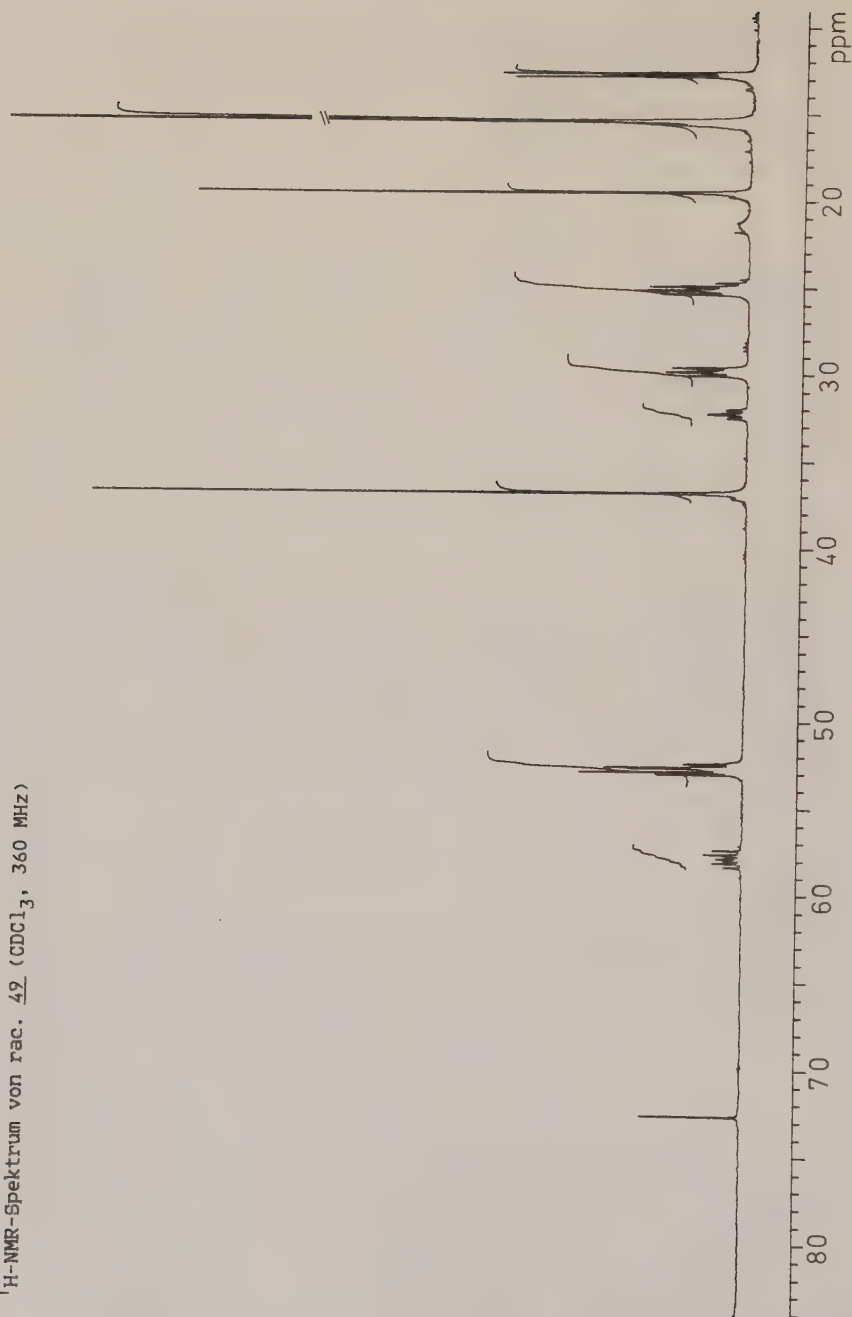
^{13}C -NMR(CDCl₃):

- 178.8 (s, C(1))
 173.6 (s, C(8³))
 160.8 (s, C(9¹))
 139.7 (s, C(4))
 136.0 (d, C(3¹))
 129.1, 127.9 (je s, C(6), C(8))
 120.1, 118.2 (je s, C(7), C(9))
 119.0 (t, C(3²))
 92.2 (d, C(5))
 80.8 (s, C(9²))
 52.8 (d, C(3))
 51.4 (q, C(8⁴))
 42.2 (d, C(2))
 35.0 (t, C(8²))
 28.5 (q, $(H_3C)_3C(9^2)$)
 21.0 (t, C(8¹))
 14.0 (q, C(2¹))
 9.3 (q, C(7¹))

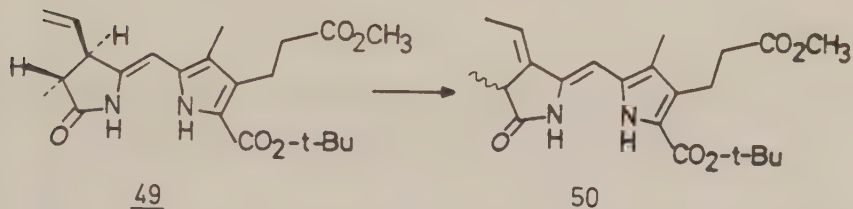
EI-MS:

- 402 (18), M⁺
 346 (100), M⁺-H₂C=C(CH₃)₂
 315 (10)
 286 (25)

^1H -NMR-Spektrum von rac. 49 (CDCl_3 , 360 MHz)



4.6.14 (Z)-(2RS)-9-tert.-Butoxycarbonyl-2,3-dihydro-2,7-dimethyl-3-(E)-ethyliden-8-[2-(methoxycarbonyl)-ethyl]-10H-dipyrriin-1-on (50)



$C_{22}H_{30}N_2O_5$
MG=402.49

Die Isomerisierung von rac. 49 zu 50 wurde im NMR-Röhrchen in $CDCl_3$ mit 1 Tropfen TFA-d durchgeführt.

Analog wurde die Reaktion mit rac. 62 (4.6.22) ausgeführt, was ebenfalls zu 50 führte.

Ausbeute: 100 %

1H -NMR($CDCl_3$):

8.74-8.63 (s, 1H, NH)

7.95-7.85 (s, 1H, NH)

6.19 (dxq, $J(2,3^1)=2.3$, $J(3^1,3^2)=7.3$, 1H, HC(3^1))

5.68 (s, 1H, HC(5))

3.68 (s, 3H, $H_3C(8^4)$)

3.22 (dxqxq, $J(2,2^1)=7.5$, $J(2,3^1)=2.3$, $J(2,3^2)=1.0$, 1H, HC(2))

3.02-2.96 (AA'XX', 2H, $H_2C(8^1)$)

2.55-2.50 (AA'XX', 2H, $H_2C(8^2)$)

1.98 (s, 3H, $H_3C(7^1)$)

1.85 (dxd, $J(2,3^2)=1.0$, $J(3^1,3^2)=7.3$, 3H, $H_3C(3^2)$)

1.56 (s, 9H, $(H_3C)_3C(9^2)$)

1.39 (d, $J(2,2^1)=7.5$, 3H, $H_3C(2^1)$)

NOE-Experimente:

1 \ 2	6.19	5.68	3.22	1.85	1.39
6.19		13.5		2.2	
5.68	13.2				
3.22				0.9	1.5
1.98		3.1			
1.85	8.8		1.2		
1.39		0.7	8.0	0.4	

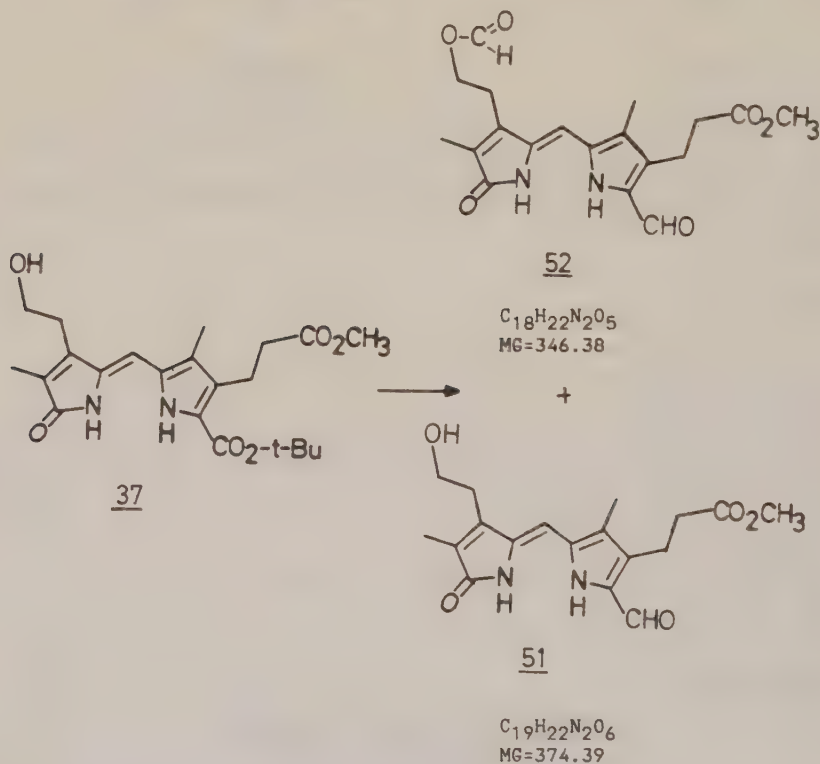
EI-MS:

402 (10), M^+

380 (23)

360 (15)
 346 (28), $M^+ - H_2C = C(CH_3)_2$
 335 (18)
 320 (45)
 305 (100)

4.6.15 (Z)-2,7-Dimethyl-9-formyl-3-(2-hydroxyethyl)-8-[2-(methoxycarbonyl)-ethyl]-10H-dipyrin-1-on (51) und (Z)-2,7-Dimethyl-9-formyl-3-[2-(formyloxy)-ethyl]-8-[2-(methoxycarbonyl)-ethyl]-10H-dipyrin-1-on (52)



100 mg 37 wurden in 40 ml TFA gelöst und nach 10 Minuten bei RT mit 25 ml Orthoameisensäure-triethylester versetzt. Nach 15 Minuten wurde Methylenchlorid zugegeben und der Ansatz vorsichtig in eiskalte Natriumhydrogencarbonat-Lösung gegeben. Es wurde mit Methylenchlorid 1x nachextrahiert, die vereinigten Methylenchloridphasen noch einmal mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 2x mit Wasser gewaschen, durch Filtration über Watte getrocknet und das LM am RV abgezogen. Die Trennung erfolgte durch PSC an Kieselgel (Methylenchlorid /Essigsäure-

ethylester/Methanol = 20:20:7). Die beiden Hauptbanden wurden eluiert, 52 chromatographierte dabei über 51.

Ausbeute: 51: 48 mg (58 %)

52: 12 mg (13 %)

51:

UV/VIS:

CH_3OH 415(sh), 395(4.40), 269(4.27), 260(sh)

$\text{CH}_3\text{OH} + (\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Zn}$ 453(4.40), 428(4.36), 405(sh), 280(sh), 275(4.34)

IR(KBr):

3480br, 3330m, 2950w, 2920w, 2870w, 1735m, 1680s, 1655s, 1635s, 1555w, 1500w, 1450m, 1440m, 1390w, 1365m, 1350w, 1300w, 1250m, 1200w, 1165m, 1110w, 1050w, 970w, 905w, 875w, 755w, 715w, 675w, 640w

^1H -NMR($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$):

9.57 (s, 1H, HC(10))

6.02 (s, 1H, HC(5))

3.78 (t, $J(3^1, 3^2) = 6.7$, 2H, $\text{H}_2\text{C}(3^2)$)

3.67 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(8^4)$)

3.04 (t, $J(8^1, 8^2) = 7.6$, 2H, $\text{H}_2\text{C}(8^1)$)

2.79 (t, $J(3^1, 3^2) = 6.7$, 2H, $\text{H}_2\text{C}(3^1)$)

2.58 (t, $J(8^1, 8^2) = 7.6$, 2H, $\text{H}_2\text{C}(8^2)$)

2.10 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(7^1)$)

1.93 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(2^1)$)

^{13}C -NMR($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$):

177.9 (d, C(10))

173.6, 173.2 (je s, C(1), C(8³))

143.2 (s, C(3))

136.2 (s, C(4))

134.4, 132.7, 130.6, 129.7, 123.7 (je s, C(2), C(6), C(7), C(8), C(9))

96.8 (d, C(5))

61.6 (t, C(3²))

51.8 (q, C(8⁴))

35.2 (t, C(8²))

28.3 (t, C(3¹))

19.3 (t, C(8¹))

8.9, 8.6 (je q, C(2¹), C(7¹))

EI-MS:

346 (47), M^+

328 (17), $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$

318 (16), $\text{M}^+ - \text{CO}$

287 (10)

272 (10)

227 (10)

208 (23)

140 (100), $\text{H}_3\text{C}-\text{C}_4\text{H}_2\text{NO}-\text{C}_2\text{H}_4\text{OH}$ **52:**UV/VIS: CH_3OH 415(sh), 395(4.45), 268(4.27), 260(sh) $\text{CH}_3\text{OH}+(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Zn}$ 454(4.49), 429(4.43), 405(sh), 284(sh), 276(4.33)IR(KBr):

3340m, 2960w, 2930w, 2858w, 1740m, 1720m, 1680s, 1655s, 1560w, 1500w, 1450w, 1395w, 1365w, 1350w, 1280w, 1260m, 1245m, 1200m, 1173m, 1060w, 1030w, 980w, 930w, 910w, 875w, 790w, 758w, 715w, 675w, 640w, 605w, 580w

 $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$:

11.00-10.86 (s, 1H, NH)

10.87-10.73 (s, 1H, NH)

9.76 (s, 1H, HC(10))

8.07 (s, 1H, HC(3³))

6.08 (s, 1H, HC(5))

4.32 (t, $J(3^1, 3^2)=7.1$, 2H, $\text{H}_2\text{C}(3^2)$)3.68 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(8)$)3.09 (t, $J(8^1, 8^2)=7.7$, 2H, $\text{H}_2\text{C}(8^1)$)2.93 (t, $J(3^1, 3^2)=7.1$, 2H, $\text{H}_2\text{C}(3^1)$)2.61 (t, $J(8^1, 8^2)=7.7$, 2H, $\text{H}_2\text{C}(8^2)$)2.17 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(7^1)$)2.04 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(2^1)$) $^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)$:

177.9 (d, C(10))

173.6, 172.7 (je s, C(1), C(8³))160.7 (d, C(3³))

141.0 (s, C(3))

135.0 (s, C(4))

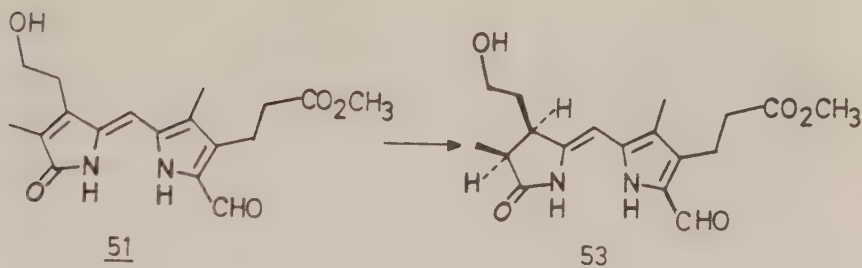
134.1, 132.3, 131.2, 130.4, 124.6 (je s, C(2), C(6), C(7), C(8), C(9))

97.0 (d, C(5))

62.5 (t, C(3²))51.7 (q, C(8⁴))35.2 (t, C(8²))24.1 (t, C(3¹))19.4 (t, C(8¹))9.0, 8.8 (je q, C(2¹), C(7¹))FI-MS:374 (100), M^+ 346 (26), M^+-CO 328 (7), $\text{M}^+-\text{CO}-\text{H}_2\text{O}$

315 (22)
300 (26)
287 (10)

4.6.16 (Z)- (2RS,3SR)-2,3-Dihydro-2,7-dimethyl-9-formyl-3-(2-hydroxy-ethyl)-8- [2-(methoxycarbonyl)-ethyl]-10H-dipyrin-1-on (rac. 53)



$C_{18}H_{24}N_2O_5$
MG=348.40

Die Reaktion wurde mit 100 mg 51 durchgeführt wie unter 4.6.8 beschrieben. Es wurde nur Hauptprodukt rac. 53 isoliert.

Ausbeute: 47 mg (47 %)

UV/VIS:

CH_3OH 350(4.12), 265(sh), 243(4.08)

$CH_3OH+(CH_3CO_2)_2Zn$ 405(4.22), 295(sh), 260(4.20)

IR(KBr):

3450m, 3340m, 2960m, 2930m, 2870w, 1740s, 1715s, 1660s, 1600s, 1542m, 1505w, 1440m, 1380w, 1355m, 1325m, 1285m, 1265m, 1250m, 1212w, 1180m, 1110w, 1070w, 1055w, 920w, 830w, 795w, 725w, 615w, 600w, 535w, 505w, 415w

$^1H-NMR(CDCl_3)$:

11.34-10.54 (s, 1H, NH)

10.87-10.07 (s, 1H, NH)

9.50 (s, 1H, HC(10))

5.43 (d, $J(3,5)=0.8$, 1H, HC(5))

3.87-3.77 (m, 2H, $H_2C(3^2)$)

3.67 (s, 3H, $H_3C(8^4)$)

3.25 (dxdd, $J(3,5)=0.8$, $J(2,3)=8.2$, $J(3,3^1_A)=6.7$, $J(3,3^1_B)=8.1$, 1H, HC(3))

3.03 (t, $J(8^1,8^2)=7.7$, 2H, $H_2C(8^1)$)

2.82 (dxq, $J(2,2^1)=7.4$, $J(2,3)=8.2$, 1H, HC(2))

2.56 (t, $J(8^1,8^2)=7.7$, 2H, $H_2C(8^2)$)

2.01 (s, 3H, $H_3C(7^1)$)

1.88 (ABxdxdxd, $J(3^1_A, 3^1_B)=14.0$, $J(3, 3^1_A)=6.7$, $J(3^1_A, 3^2_A) \approx J(3^1_A, 3^2_B) \approx 7$, 1H, $H_A C(3^1)$)

1.74 (ABxdxdxd, $J(3^1_A, 3^1_B)=14.0$, $J(3, 3^1_B)=8.1$, $J(3^1_B, 3^2_A) \approx J(3^1_B, 3^2_B) \approx 7$, 1H, $H_B C(3^1)$)

1.20 (d, $J(2, 2^1)=7.4$, 3H, $H_3C(2^1)$)

^{13}C -NMR(CDCl₃):

181.4 (s, C(1))

176.5 (d, C(10))

173.4 (s, C(8³))

142.6 (s, C(4))

135.9, 134.7, 128.7, 119.4 (je s, C(6), C(7), C(8), C(9))

91.4 (d, C(5))

59.5 (t, C(3²))

51.8 (q, C(8⁴))

40.9, 39.4 (je d, C(2), C(3))

35.5 (t, C(8²))

31.3 (t, C(3¹))

19.5 (t, C(8¹))

10.7 (q, C(2¹))

8.8 (q, C(7¹))

FI-MS:

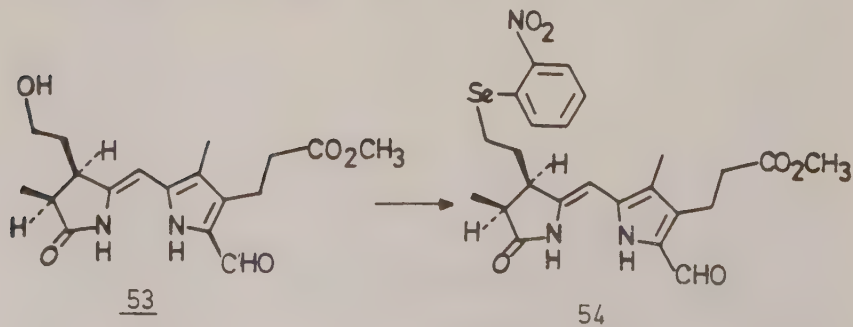
348 (33), M^+

125 (100)

110 (47)

96 (60)

4.6.17 (Z)-(2RS,3SR)-2,3-Dihydro-2,7-dimethyl-9-formyl-3-[2-(2-nitrophenylselenenyl)-ethyl]-8-[2-(methoxycarbonyl)-ethyl]-10H-dipyr-rin-1-on (rac. 54)



$C_{24}H_{27}N_3O_6Se$
MG=532.45

Die Reaktion wurde mit 47 mg rac. 53 ausgeführt wie unter 4.6.11 beschrieben. Als FM wurde jedoch Methylenchlorid/Essigsäure-ethylester/Methanol = 20:20:7 verwendet.

Ausbeute: 51 mg (71 %)

UV/VIS:

CH₃OH 410(sh), 358(4.06), 248(4.25)

CH₃OH+(CH₃CO₂)₂Zn 406(4.20), 257(4.33)

IR(KBr):

3420br, 3320m, 3110w, 3030w, 2940w, 2860w, 1738s, 1725s, 1660s, 1602s, 1565w, 1545w, 1510s, 1450m, 1438m, 1385w, 1330s, 1300m, 1265m, 1255m, 1230w, 1195m, 1165m, 1095m, 1040m, 985w, 920w, 855w, 830w, 785w, 760w, 720m, 705w, 690w, 680w, 650w, 600w, 530w

¹H-NMR(CDCl₃ + CD₃OD):

9.44 (s, 1H, HC(10))

8.30 (d*, J(3⁵,3⁶)=8.0, 1H, HC(3⁵))

7.54-7.52 (m, 2H, HC(3⁷) + HC(3⁸))

7.36 (dxdxd, J(3⁵,3⁶)=8.0, J(3⁶,3⁷)=5.2, J(3⁶,3⁸)=3.4, 1H, HC(3⁶))

5.46 (d, J(3,5)=0.9, 1H, HC(5))

3.67 (s, 3H, H₃CO(8⁴))

3.26 (dxdxdxd, J(3,5)=0.9, J(2,3)=8.2, J(3,3¹_A)=6.3, J(3,3¹_B)=8.2, 1H, HC(3))

3.07-2.91 (m, 2H, H₂C(3²))

3.02 (t, J(8¹,8²)=7.6, 2H, H₂C(8¹))

2.89 (dxq, J(2,3)=8.2, J(2,2¹)=7.4, 1H, HC(2))

2.57 (t, J(8¹,8²)=7.6, 2H, H₂C(8²))

2.15-1.92 (m, 2H, H₂C(3¹))

1.96 (s, 3H, H₃C(7¹))

1.23 (d, J(2,2¹)=7.4, 3H, H₃C(2¹))

*J(3⁵,3⁷) nicht aufgelöst

¹³C-NMR(CDCl₃):

180.6 (s, C(1))

176.4 (d, C(10))

173.1 (s, C(8³))

147.1, 132.6 (je s, C(3³), C(3⁴))

141.2, 135.7, 134.2, 128.8, 119.6 (je s, C(4), C(6), C(7), C(8), C(9))

133.8, 129.1, 126.6, 125.9 (je d, C(3⁵), C(3⁶), C(3⁷), C(3⁸))

91.6 (d, C(5))

51.8 (q, C(8⁴))

44.5 (d, C(3))

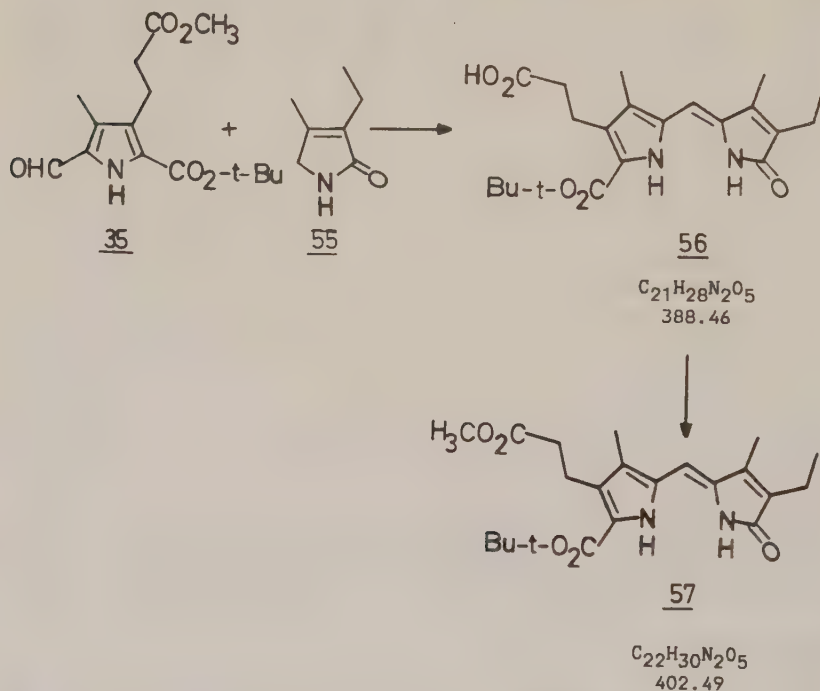
39.3 (d, C(2))

35.5 (t, C(8²))

28.1 (t, C(3²))

23.3 (t, C(3¹))19.4 (t, C(8¹))10.1 (q, C(2¹))8.8 (q, C(7¹))FAB-MS(2-Nitrophenyl-octylether):532, M⁺+1

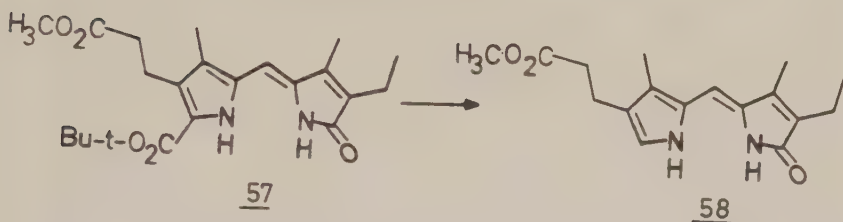
4.6.18 (Z)-9-tert.-Butoxycarbonyl-3,7-dimethyl-2-ethyl-8-[2-(methoxycarbonyl)-ethyl]-10H-dipyrin-1-on (57)



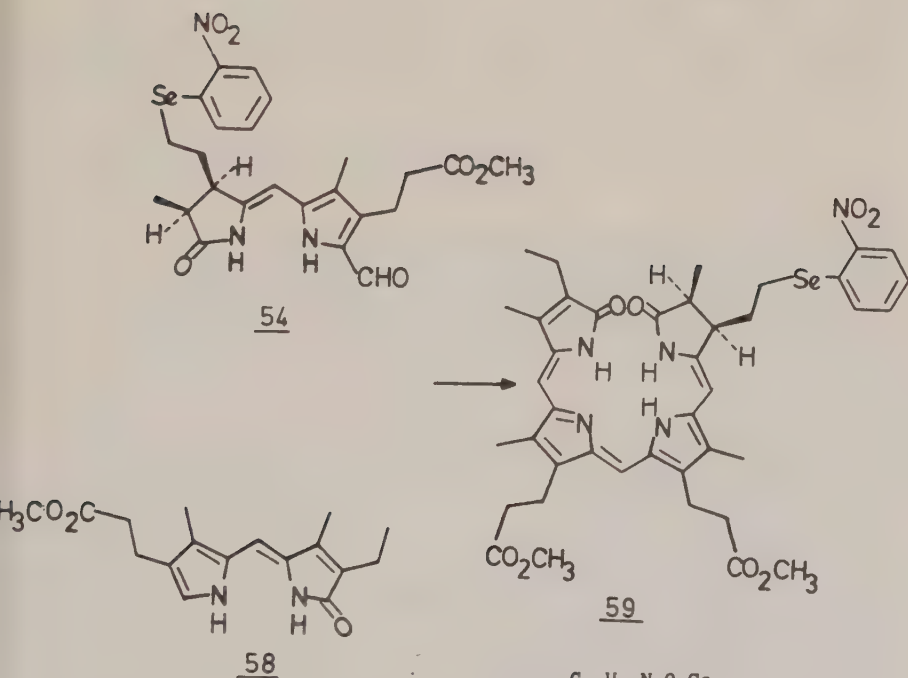
Die Kondensation von 35 mit 55* und die Veresterung von 56 wurde ausgeführt wie unter 4.6.6 und 4.6.7 beschrieben. Für spektroskopische Daten vgl. [123].

*wurde mir freundlicherweise von Herrn Prof. Gossauer zur Verfügung gestellt

4.6.19 (Z,Z,Z)-(2RS,3SR)-8,12-bis-[2-(Methoxycarbonyl)-ethyl]-18-ethyl-1,2,3,19,22,24-hexahydro-3-[2-(2-nitro-phenylselenyl)-ethyl]-2,7,13,17-tetramethyl-21H-bilin-1,19-dion (rac. 59)



$C_{17}H_{22}N_2O_3$
MG=302.37



$C_{41}H_{47}N_5O_8Se$
MG=816.81

8 mg 57 wurden in 2 ml TFA gelöst und nach 15 Minuten bei RT das LM mit Stickstoff abgeblasen. Rückstand 58 wurde in 1 ml Chloroform aufgenommen und zu 10 mg rac. 54 in 9 ml Chloroform gegeben. Unter Begasung mit Stickstoff wurde auf 0°C abgekühlt und mit 0.5 ml Kondensationsreagenz versetzt. (Kondensationsreagenz: Es wurden 1.025g 2,6-

Di-tert.-butyl-4-methylpyridin unter Stickstoff in 25 ml Chloroform gelöst und mit 1.43 g Phosphorylbromid versetzt [116]. Das Reagenz wurde unter Stickstoff bei -20°C aufbewahrt.) Der Reaktionsansatz wurde 40 Minuten bei 0°C gerührt und dann nach Zugabe von Methylenchlorid 1x mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 3x mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Watte filtriert und das LM am RV abgezogen. Reinigung erfolgte durch PSC an Kieselgel (Methylenchlorid/Essigsäure-ethylester = 1:1). Die blaue Hauptbande hatte einen R_f -Wert von 0.8.

Ausbeute: 9 mg (58 %)

UV/VIS:

CHCl_3 590(4.17), 348(4.54), 275(4.33), 260(4.38)

in Klammern: relative Intensitäten

CHCl_3 590(0.43), 348(1), 275(0.68), 260(0.74)

CH_3OH 590(0.43), 344(1), 270(0.64), 255(0.70)

$\text{CH}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{SO}$ 655(0.92), 352(1), 335(0.96), 270(0.58), 251(0.74)

$\text{CH}_3\text{OH}+(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Zn}$ 645(0.85), 372(0.92), 344(1), 274(sh), 250(0.89)

IR(CHCl_3):

3470br, 3410w, 3000m, 2960w, 2930w, 1710s, 1630w, 1593w, 1510w, 1437m, 1415m, 1362s, 1305w, 1215br, 1165w, 1090m, 980w, 960w, 900w, 860w

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3):

8.29 (dxd, $J(3^5,3^6)=8.3$, $J(3^5,3^7)=1.3$, 1H, HC(3^5))

7.55 (ABxd, $J(3^7,3^8)=8.1$, $J(3^6,3^8)=1.4$, 1H, HC(3^8))

7.50 (ABxdxd, $J(3^7,3^8)=8.1$, $J(3^6,3^7)=6.9$, $J(3^5,3^7)=1.3$, 1H, HC(3^7))

7.32 (dxdxd, $J(3^5,3^6)=8.3$, $J(3^6,3^7)=6.9$, $J(3^6,3^8)=1.4$, 1H, HC(3^6))

6.69 (s, 1H, HC(10))

5.98 (s, 1H, HC(15))

5.54 (d, $J(3,5)=0.7$, 1H, HC(5))

3.673, 3.666 (je s, 6H, $\text{H}_3\text{CO}(8^4)$, $\text{H}_3\text{CO}(12^4)$)

3.38 (dxdxdxd, $J(3,5)=0.7$, $J(2,3)=8.1$, $J(3,3^1_A)\approx J(3,3^1_B)\approx 7$, 1H, HC(3))

3.12-2.99 (m, 2H, $\text{H}_2\text{C}(3^2)$)

2.95 (t, $J(12^1,12^2)=7.5$, 2H, $\text{H}_2\text{C}(12^1)$)

2.90 (t, $J(8^1,8^2)=7.5$, 2H, $\text{H}_2\text{C}(8^1)$)

2.87 (dxq, $J(2,3)=8.1$, $J(2,2^1)=7.5$, 1H, HC(2))

2.56 (t, $J(12^1,12^2)=7.5$, 2H, $\text{H}_2\text{C}(12^2)$)

2.54 (t, $J(8^1,8^2)=7.5$, 2H, $\text{H}_2\text{C}(8^2)$)

2.30 (q, $J(18^1,18^2)=7.5$, 2H, $\text{H}_2\text{C}(18^1)$)

2.17-2.03 (m, 2H, $\text{H}_2\text{C}(3^1)$), überlagert mit

2.12 (s, 6H, $\text{H}_3\text{C}(13^1)$ + $\text{H}_3\text{C}(17^1)$)

1.96 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(7^1)$)

1.14 (d, $J(2,2^1)=7.5$, 3H, $\text{H}_3\text{C}(2^1)$)

1.10 (t, $J(18^1,18^2)=7.5$, 3H, $\text{H}_3\text{C}(18^2)$)

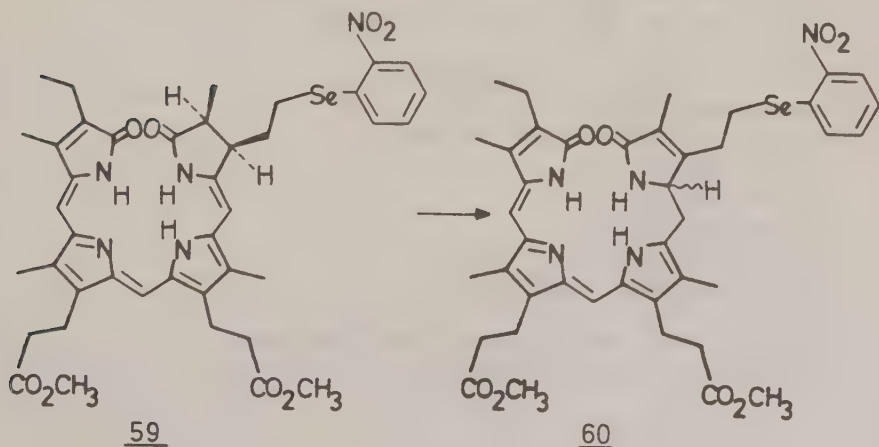
NOE-Experimente:

1	2	5.98	5.54	3.38	3.12 2.99	2.95	2.90	2.56	2.54	2.17 2.03	1.96	1.14
7.55					7.9						0.4	
7.50												
6.69						3.4		0.8				
5.98										2.4		
5.54				1.9	1.6					+	2.0	
3.38			3.4									
3.12-2.99			4.0							+		
2.95										+		
2.90								1.8			1.2	
2.87				3.8								1.5
2.56										+		
2.54						2.7					0.7	
2.12	1.8					5.5						
2.17-2.03					+							2.8
1.96			7.2			0.2						

FAB-MS(2-Nitrophenyl-octylether):

817, $M^{+}+1$

4.6.20 (Z,Z)-(4RS)-8,12-bis-[2-(Methoxycarbonyl)-ethyl]-18-ethyl-1,4,5,19,22,24-hexahydro-3-[2-(2-nitro-phenylselenyl)-ethyl]-2,7,13,17-tetramethyl-21H-bilin-1,19-dion (**60**)



$C_{41}H_{47}N_5O_8Se$
 MG=816.81

60 wurde quantitativ aus rac. 59 mit saurem Chloroform (vgl. 4.6.10) erhalten.

UV/VIS:

CHCl_3 564(4.30), 400(sh), 329(4.43), 255(4.26)

in Klammern: relative Intensitäten

CHCl_3 564(0.69), 400(sh), 329(1), 255(0.59)

CH_3OH 557(0.66), 400(sh), 326(1), 250(0.63)

$\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{SO}_4$ 586(1.14), 566(1.13), 380(sh), 326(1), 250(0.50)

$\text{CH}_3\text{OH} + (\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Zn}$ 627(1.47), 567(0.45), 400(sh), 337(1), 250(0.46)

IR(CHCl_3):

3440w, 3000w, 2950w, 2930w, 2858w, 1730m, 1690s, 1630w, 1595m, 1515m, 1455w, 1438m, 1395w, 1360w, 1335m, 1305m, 1270m, 1165m, 1095w, 1060w, 1035w, 965w, 910w, 865w, 830w

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3):

8.27 (d*, $J(3^5, 3^6)=8.2$, 1H, HC(3⁵))

7.466 (ABxd, $J(3^7, 3^8)=8.2$, $J(3^6, 3^8)=2.8$, 1H, HC(3⁸))

7.463 (ABxd*, $J(3^7, 3^8)=8.2$, $J(3^6, 3^7)=5.6$, 1H, HC(3⁷))

7.30 (dxdxd, $J(3^5, 3^6)=8.2$, $J(3^6, 3^7)=5.6$, $J(3^6, 3^8)=2.8$, 1H, HC(3⁶))

7.08 (s, 1H, NH)

6.77 (s, 1H, HC(10))

5.92 (s, 1H, HC(15))

4.61-4.53 (br**, 1H, HC(4))

3.67, 3.64 (je s, 6H, $\text{H}_3\text{CO}(8^4)$, $\text{H}_3\text{CO}(12^4)$)

3.13 (ABxd, $J(5_A, 5_B)=5.2$, $J(4, 5_A)=5.0$, 1H, $\text{H}_A\text{C}(5)$)

3.03-2.94 (m, 2H, $\text{H}_2\text{C}(3^2)$)

2.94-2.87 (m, 6H, $\text{H}_2\text{C}(8^1) + \text{H}_2\text{C}(12^1) + \text{H}_B\text{C}(5) + \text{H}_A\text{C}(3^1)$)

2.67-2.58 (m, $\text{H}_B\text{C}(3^1)$)

2.53 (t, $J(12^1, 12^2)=7.6$, 2H, $\text{H}_2\text{C}(12^2)$)

2.50 (t, $J(8^1, 8^2)=7.6$, 2H, $\text{H}_2\text{C}(8^2)$)

2.37 (q, $J(18^1, 18^2)=7.6$, 2H, $\text{H}_2\text{C}(18^1)$)

2.11 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(17^1)$)

2.07 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(13^1)$)

1.95 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(7^1)$)

1.76 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(2^1)$)

1.10 (t, $J(18^1, 18^2)=7.6$, 3H, $\text{H}_3\text{C}(18^2)$)

* $J(3^5, 3^7)$ nicht aufgelöst, Signale nur leicht verbreitert.

** $J(4, 5_A)$ und $J(4, 5_B)$ nicht aufgelöst.

NOE-Experimente:

1	2	6.77	5.92	4.61-4.53	3.13	3.03-2.87	2.11	2.07	1.95	1.76
7.08				3.9					0.4	
6.77						4.5				
5.92							3.3	3.5		
4.61-4.53					3.4	1.8				
3.13				1.7		1.1				
2.94-2.87	9.7			3.8	12.7			+	1.3	2.0
2.67-2.58						4.4				
2.53								+		
2.50	2.4					5.8			+	
2.37							+			
2.11		7.4								
2.07		6.8				1.3				
1.95						1.7				
1.76						0.5				
1.10							1.1			

FAB-MS(2-Nitrophenyl-octylether):817, $M^{+}+1$

zuvor gegen gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung geschüttelt worden war, zugegeben und 2x mit eiskalter Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie 1x mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde durch Filtration über Watte getrocknet und das LM am RV abgezogen. Das Produktgemisch wurde ohne weitere Reinigung zur NMR-Spektroskopie verwendet. Das Reaktionsgemisch enthielt das gewünschte Produkt rac. 61 sowie Z-PCBdme (20), das vermutlich durch säurekatalysierte Umlagerung des ersteren gebildet wurde. Zur quantitativen Herstellung von 20 wurde das Reaktionsgemisch nach Extraktion an Kieselgel chromatographiert (Methylenchlorid/Essigsäure-ethylester = 2:1).

rac. 59:

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): Differenzspektrum

- 6.66 (s, 1H, $\text{HC}(15)$)
 5.98 (s, 1H, $\text{HC}(10)$)
 5.82 (AXxBXxd , $J(3^1\text{X}, 3^2\text{A})=9.3$, $J(3^1\text{X}, 3^2\text{B})=16.9$, $J(3, 3^1\text{X})=9.4$, 1H, $\text{H}_\text{X}\text{C}(3^1)$)
 5.43 (d, $J(3, 5)=1.4$, 1H, $\text{HC}(5)$)
 5.26 (ABxBX , $J(3^2\text{A}, 3^2\text{B})=1.7$, $J(3^2\text{B}, 3^1\text{X})=16.9$, 1H, $\text{H}_\text{B}\text{C}(3^2)$)
 5.25 (ABxAX , $J(3^2\text{A}, 3^2\text{B})=1.7$, $J(3^2\text{A}, 3^1\text{X})=9.3$, 1H, $\text{H}_\text{A}\text{C}(3^2)$)
 3.89 (dxdxd , $J(2, 3)=9.4$, $J(3, 3^1\text{X})=9.4$, $J(3, 5)=1.4$, 1H, $\text{HC}(3)$)
 3.67, 3.66 (je s, 6H, $\text{H}_3\text{CO}(8^4)$, $\text{H}_3\text{CO}(12^4)$)
 2.94, 2.89 (je t, $J(8^1, 8^2)=J(12^1, 12^2)=7.6$, 4H, $\text{H}_2\text{C}(8^1)$, $\text{H}_2\text{C}(12^1)$)
 2.81 (dxq , $J(2, 2^1)=7.6$, $J(2, 3)=9.4$, 1H, $\text{HC}(2)$)
 2.55, 2.54 (je t, $J(8^1, 8^2)=J(12^1, 12^2)=7.6$, 4H, $\text{H}_2\text{C}(8^2)$, $\text{H}_2\text{C}(12^2)$)
 2.33 (q, $J(18^1, 18^2)=7.6$, 2H, $\text{H}_2\text{C}(18^1)$)
 2.11 (s, 6H, $\text{H}_3\text{C}(13^1)$ + $\text{H}_3\text{C}(17^1)$)
 1.99 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(7^1)$)
 1.104 (d, $J(2, 2^1)=7.6$, 3H, $\text{H}_3\text{C}(2^1)$)
 1.102 (t, $J(18^1, 18^2)=7.6$, 3H, $\text{H}_3\text{C}(18^2)$)

20:

UV/VIS:

	$\lambda_{\text{max}}^{\text{UV}}$	$\lambda_{\text{max}}^{\text{vis}}$	$\frac{E^{\text{UV}}}{E^{\text{vis}}}$
CHCl_3	364	600	2.85
CH_3OH	360	610	2.86
$\text{CH}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{SO}_4$	370	685	1.21
$\text{CH}_3\text{OH}+(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Zn}$	370	659	1.17

IR(CHCl_3):

3425w, 2950w, 2925m, 2858w, 1725s, 1690s, 1585m, 1455m, 1447m, 1405w, 1355m, 1275m, 1195m, 1165m, 1095w, 960w, 905w, 855w, 825w

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$:

6.69 (s, 1H, HC(10))

6.00 (s, 1H, HC(15))

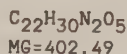
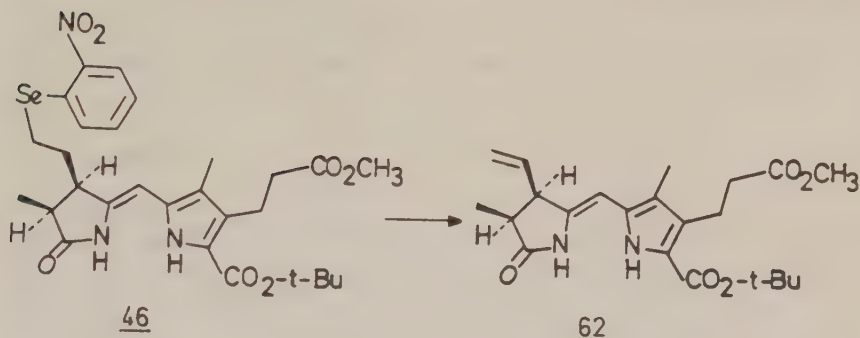
5.91 (s, 1H, HC(5))

5.89 (qxd, $J(3^1, 3^2)=7.5$, $J(2, 3^1)=2.0$, 1H, HC(3¹))3.679, 3.675 (je s, 6H, $\text{H}_3\text{CO}(8^4)$, $\text{H}_3\text{CO}(12^4)$)3.08 (dxqxq, $J(2, 3^1)=2.0$, $J(2, 3^2)=1.5$, $J(2, 2^1)=7.6$, 1H, HC(2))2.95 (t, $J(12^1, 12^2)=7.5$, 2H, $\text{H}_2\text{C}(12^1)$)2.92 (t, $J(8^1, 8^2)=7.5$, $\text{H}_2\text{C}(8^1)$)2.560(t, $J(12^1, 12^2)=7.5$, 2H, $\text{H}_2\text{C}(12^2)$)2.555(t, $J(8^1, 8^2)=7.5$, 2H, $\text{H}_2\text{C}(8^2)$)2.32 (q, $J(18^1, 18^2)=7.6$, 2H, $\text{H}_2\text{C}(18^1)$)2.13 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(17^1)$)2.12 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(13^1)$)2.08 (dxd, $J(2, 3^2)=1.5$, $J(3^1, 3^2)=7.5$, 3H, $\text{H}_3\text{C}(3^2)$)2.05 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}(7^1)$)1.26 (d, $J(2, 2^1)=7.6$, 3H, $\text{H}_3\text{C}(2^1)$)1.09 (t, $J(18^1, 18^2)=7.6$, 3H, $\text{H}_3\text{C}(18^2)$)NOE-Experimente:

1	2	6.69	6.00	5.91	5.89	3.08	2.95	2.92	2.32	2.13	2.12	2.08	2.05	1.26
6.69							4.9							
6.00										3.1				
5.91												2.5	3.5	
5.89						3.0						1.8		0.6
3.08				1.9										0.9
2.95										0.7				
2.92	7.7												1.0	
2.560										0.5				
2.555	1.5						1.4						0.4	
2.32										+				
2.13														
2.12		11.0					1.7							
2.08				10.7										
2.05							1.3							
1.26				2.7	10.3									
1.09									5.4					

FAB-MS(2-Nitrophenyl-octylether):614, M^+

- 4.6.22 (Z)-(2RS,3SR)-9-tert.-Butoxycarbonyl-2,3-dihydro-2,7-dimethyl-3-ethenyl-8-[2-(methoxycarbonyl)-ethyl]-10H-dipyrroin-1-on (rac. 62)



5 mg rac. 46 wurden wie unter 4.6.13 beschrieben umgesetzt.
Ausbeute: 3 mg (94 %)

UV/VIS:

CH_3OH 316(4.23), 250(sh), 227(4.14)

$CH_3OH + (CH_3CO_2)_2Zn$ 358(4.25), 305(sh), 295(sh), 273(4.04), 237(4.28)

IR(CHCl₃):

3420br, 3000w, 2980w, 2950w, 2930w, 2860w, 1725s, 1673s, 1490w, 1450w, 1435m, 1390w, 1367m, 1337m, 1290m, 1265m, 1250m, 1210m, 1160m, 1137m, 1050w, 1035w, 990w, 960w, 925w, 865w, 840w

¹-H-NMR(CDCl₃):

8.84-8.76 (s, 1H, NH)

8.16-8.08 (s, 1H, NH)

5.75 (AXXBXd, $J(3^1_X, 3^2_A)=10.6$, $J(3^1_X, 3^2_B)=15.7$, $J(3, 3^1_X)=8.9$, 1H, $H_XC(3^1)$)

5.265 (d, $J(3, 5)=0.8$, 1H, $HC(5)$)

5.260 (ABxAX, $J(3^2_A, 3^2_B)=1.6$, $J(3^1_X, 3^2_A)=10.6$, 1H, $H_A C(3^2)$)

5.253 (ABxBX, $J(3^2_A, 3^2_B)=1.6$, $J(3^1_X, 3^2_B)=15.7$, 1H, $H_B C(3^2)$)

3.71 (dxdx, $J(3, 5)=0.8$, $J(3, 3^1_X)=8.9$, $J(2, 3)=7.5$, 1H, $HC(3)$)

3.67 (s, 3H, $H_3C(8^4)$)

3.00-2.95 (AA'XX', 2H, $H_2C(8^1)$)

2.81 (dxq, $J(2, 3)=7.5$, $J(2, 2^1)=7.6$, 1H, $HC(2)$)

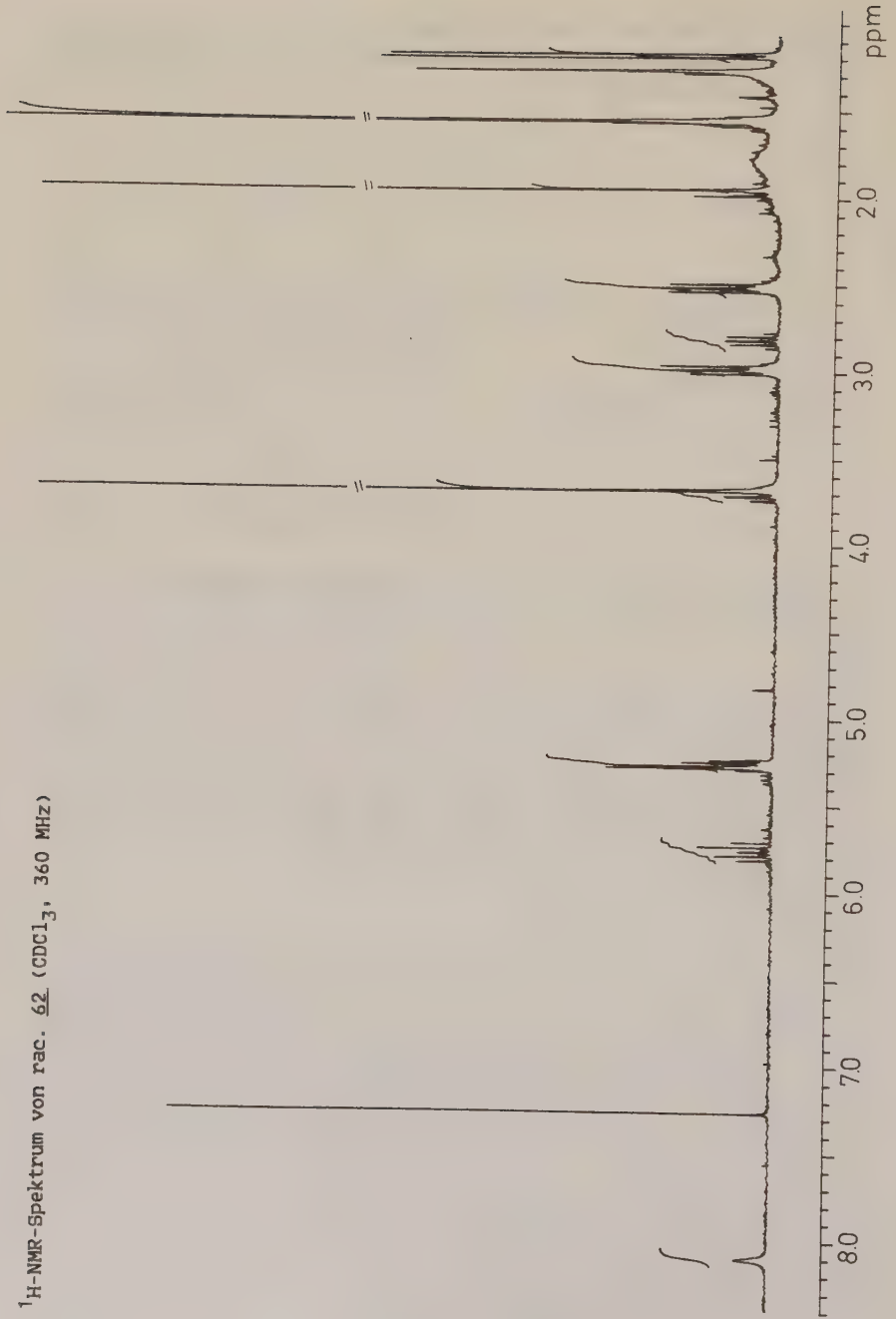
2.53-2.48 (AA'XX', 2H, $H_2C(8^2)$)

1.94 (s, 3H, $H_3C(7^1)$)

1.55 (s, 9H, $(H_3C)_3C(9^2)$)

1.17 (d, $J(2, 2^1)=7.6$, 3H, $H_3C(2^1)$)

^1H -NMR-Spektrum von rac. 62 (CDCl_3 , 360 MHz)



EI-MS:402 (65), M^+ 346 (100), $M^+ - H_2C=C(CH_3)_2$

327 (16)

315 (36), $M^+ - CH_2CH_2CO_2CH_3$ und/oder $M^+ - CO_2C(CH_3)_3$ 302 (18), $M^+ - CO_2C(CH_3)_3 + 1$

286 (62)

272 (25)

5 Literaturverzeichnis

- [1] A. F. McDonagh. Bile pigments: Bilatriens and 5,15-Biladienes. Kap. 6 in: The Porphyrins, Vol. VI, D. Dolphin, Ed., Academic Press, New York, San Francisco, London
- [2] W. Siedel, H. Fischer. Constitution of the bile pigment. X. Bilirubin, synthesis of neo- and isoneoxanthobilirubinic acid. Z. physiol. Chem. 214, 145 (1933)
- [3] R. Schmid, A. F. McDonagh. Formation and metabolism of bile pigments in vivo. Kap. 5 in: The Porphyrins, Vol. VI, D. Dolphin, Ed., Academic Press, New York, San Francisco, London
- [4] Z. J. Petryka, R. B. Howe. Historical and clinical aspects of bile pigments. Kap. 12 in: The Porphyrins, Vol. VI, D. Dolphin, Ed., Academic Press, New York, San Francisco, London
- [5] L. Abolins, W. Rüdiger. Über die farbgebende Gruppe von Crenilabrus-Blau. Experientia 22, 298 (1966)
- [6] W. Rüdiger, L. Abolins. Zur Bindung von Biliverdin an das Protein im Crenilabrus-Blau. Experientia 25, 574 (1969)
- [7] W. Rüdiger, W. Klose, M. Vuillaume, M. Barbier. Sur la biliverdin IX α . Pigment vert des insects orthoptères, Clitumnus extradentatus et Mantis religiosa. Bull. Soc. Chim. Biol. 51, 559 (1969)
- [8] W. Rüdiger, W. Klose. Über die Pigmente der Florfliege Chrysopa carnea. Experientia 26, 498 (1970)
- [9] W. Rüdiger. Über die Abwehrfarbstoffe von Aplysia-Arten, I. Aplysiocyanin, ein neuartiger Gallenfarbstoff. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 129 (1967)
- [10] W. Rüdiger. Über die Abwehrfarbstoffe von Aplysia-Arten, II. Die Struktur von Aplysiocyanin. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 1554 (1967)
- [11] K. Yamaguchi, T. Ogata. Isolation and characterization of a biliprotein from the ovary of a turban shell, Turbo cornutus. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 44, 631 (1978)
- [12] T. Ogata, N. Fusetani, K. Yamaguchi. Turboverdin, a new bile pigment from a turban shell, Turbo cornutus. Comp. Biochem. Physiol. 63B, 239 (1979)
- [13] W. Rüdiger, W. Klose, M. Vuillaume, M. Barbier. On the structure

- of pterobilin, the blue pigment of Pieris brassicae. *Experientia* 24, 1000 (1968)
- [14] M. Choussy, M. Barbier. Ptérobiline et néoptérobilines, réactivité et structures. *Helv. Chim. Acta* 58, 2651 (1975)
- [15] M. Bois-Choussy, M. Barbier. Structure de la sarpédobiline, pigment biliaire de Lépidoptère. *Experientia* 33, 1407 (1977)
- [16] H. Kayser, K. Dettner. Biliverdin IX_γ in beetles (Dytiscidae: Laccophilinae). *Comp. Biochem. Physiol.* 77B, 639 (1984)
- [17] W. Rüdiger. Chemistry of the phytochrome photoconversions. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 303, 377 (1983)
- [18] J. C. Lagarias. Progress in the molecular analysis of phytochrome. *Photochem. Photobiol.* 42, 811 (1985)
- [19] F. T. Kützing. *Phycologia generalis*, Leipzig 1843
- [20] T. W. Engelmann. Untersuchungen über die quantitativen Beziehungen zwischen Absorption des Lichtes und Assimilation in Pflanzenzellen. *Bot. Z.* 42, 81 (1884)
- [21] H. Molisch. Das Phycoerythrin, seine Krystallisirbarkeit und chemische Natur. *Bot. Z.* 52, 179 (1894)
- [22] H. Molisch. Das Phycocyan, ein krystallisirbarer Eiweisskörper. *Bot. Z.* 53, 131 (1895)
- [23] R. Lemberg. Die Chromoproteide der Rotalgen. I. *Liebigs Ann. Chem.* 461, 46 (1928)
- [24] R. Lemberg. Chromoproteide der Rotalgen. II. Spaltung mit Pepsin und Säuren. Isolierung eines Pyrrolfarbstoffs. *Liebigs Ann. Chem.* 477, 195 (1930)
- [25] P. O'Carra, C. O'hEocha. Bilins released from algae and biliproteins by methanolic extraction. *Phytochemistry* 5, 993 (1966)
- [26] C. O'hEocha. Comparative biochemical studies of the phycobilins. *Arch. Biochem. Biophys.* 73, 207 (1958)
- [27] B. L. Schram, H. H. Kroes. Structure of phycocyanobilin. *Eur. J. Biochem.* 19, 581 (1971)
- [28] H. W. Siegelman, D. J. Chapman, W. J. Cole. Enzymatic cleavage of phycocyanobilin. *Arch. Biochem. Biophys.* 122, 261 (1971)
- [29] W. Rüdiger, P. O'Carra, C. O'hEocha. Structure of phycoerythrobin and phycocyanobilin. *Nature* 215, 1477 (1967)
- [30] W. Rüdiger, P. O'Carra. Studies on the structures and apoprotein linkages of the phycobilins. *Eur. J. Biochem.* 7, 509 (1969)

- [31] W. J. Cole, D. J. Chapman, H. W. Siegelman. The structure of phycocyanobilin. *J. Am. Chem. Soc.* 89, 3643 (1967)
- [32] W. J. Cole, D. J. Chapman, H. W. Siegelman. The structure and properties of phycocyanobilin and related bilatriens. *Biochemistry* 7, 2929 (1968)
- [33] H. L. Crespi, L. J. Boucher, D. G. Norman, J. J. Katz, R. C. Dougherty. Structure of phycocyanobilin. *J. Am. Chem. Soc.* 89, 3642 (1967)
- [34] H. L. Crespi, U. Smith, J. J. Katz. Phycocyanobilin. Structure and exchange studies by nuclear magnetic resonance and its mode of attachment in phycocyanin. A model for phytochrome. *Biochemistry* 7, 2232 (1968)
- [35] A. Gossauer, W. Hirsch. Synthesen von Gallenfarbstoffen, IV. Totalsynthese des racemischen Phycocyanobilins (Phycobiliverdins) sowie eines "Homophycobiliverdins". *Liebigs Ann. Chem.* 1974, 1496
- [36] A. Gossauer, R.-P. Hinze. An improved chemical synthesis of racemic phycocyanobilin dimethyl ester. *J. Org. Chem.* 43, 283 (1978)
- [37] A. Gossauer, J.-P. Weller. Chemical total synthesis of (+)-(2R,16R)- and (+)-(2S,16R)-phycoerythrobilin dimethyl ester. *J. Am. Chem. Soc.* 100, 5928 (1978)
- [38] A. Gossauer, E. Klahr. Synthesen von Gallenfarbstoffen, VIII. Totalsynthese des racem. Phycoerythrobilin-dimethylesters. *Chem. Ber.* 112, 2243 (1979)
- [39] A. N. Glazer, G. Cohen-Bazire. A comparison of cryptophytan phycocyanins. *Arch. Microbiol.* 104, 29 (1975)
- [40] D. Guard-Friar, R. McColl. Subunit separation (α, α', β) of cryptomonad biliproteins. *Photochem. Photobiol.* 43, 81 (1986)
- [41] J. Jung, P.-S. Song, R. J. Paxton, M. S. Edelstein, R. Swanson, E. E. Hazen. Molecular topography of the phycocyanin photoreceptor from *Chroomonas* species. *Biochemistry* 19, 24 (1980)
- [42] J. O. Nagy, J. E. Bishop, A. V. Klotz, A. N. Glazer, H. Rapoport. Bilin attachment sites in the α , β , and γ subunits of R-phycoerythrin. Structural studies on singly and doubly linked phycourobilins. *J. Biol. Chem.* 260, 4864 (1985)
- [43] S. D. Killilea, P. O'Carra. Structure and apoprotein linkages of

- phycourobilin. *Biochem. J.* 226, 723 (1985)
- [44] S. Schoch, G. Klein, U. Linsenmeier, W. Rüdiger. Synthese und Reaktionen von Äthyliden-Methylsuccinimid. *Tetrahedron Lett.* 20, 2465 (1974)
- [45] E. Köst-Reyes, H.-P. Köst, W. Rüdiger. Über die Bindungen zwischen Chromophor und Protein in Biliproteiden, II. Nachweis von Cystein als bindende Aminosäure in B-Phycoerythrin. *Liebigs Ann. Chem.* 1975, 1594
- [46] J. C. Lagarias, A. N. Glazer, H. Rapoport. Chromopeptides from C-phycocyanin. Structure and linkage of a phycocyanobilin bound to the β subunit. *J. Am. Chem. Soc.* 101, 5030 (1979)
- [47] R. W. Schoenleber, S.-L. Leung, D. J. Lundell, A. N. Glazer, H. Rapoport. Chromopeptides from phycoerythrins. Structure and linkage of a phycoerythrobilin tryptic tripeptide derived from a B-phycoerythrin. *J. Am. Chem. Soc.* 105, 4072 (1983)
- [48] R. W. Schoenleber, D. J. Lundell, A. N. Glazer, H. Rapoport. Bilin attachment sites in the α and β subunits of B-phycoerythrin. Structural studies on a doubly peptide-linked phycoerythrobilin. *J. Biol. Chem.* 259, 5481 (1984)
- [49] J. E. Bishop, J. C. Lagarias, J. O. Nagy, R. W. Schoenleber, H. Rapoport, A. V. Klotz, A. N. Glazer. Phycobiliprotein-bilin linkage diversity. I. Structural studies on A- and D-ring-linked phycocyanobilins. *J. Biol. Chem.* 261, 6790 (1986)
- [50] A. V. Klotz, A. N. Glazer, J. E. Bishop, J. O. Nagy, H. Rapoport. Phycobiliprotein-bilin linkage diversity. II. Structural studies on A- and D-ring-linked phycoerythrobilins. *J. Biol. Chem.* 261, 6797 (1986)
- [51] R. W. Schoenleber, Y. Kim, H. Rapoport. Relative stereochemistry of the A ring of plant bile pigments. *J. Am. Chem. Soc.* 106, 2645, (1984)
- [52] A. Gossauer. Studies on the stereochemistry of biliprotein chromophores and related model compounds. *Tetrahedron* 39, 1933 (1983)
- [53] W. Rüdiger. Phycobiliproteide. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 88, 125 (1975)
- [54] W. Rüdiger. Struktur und Spektraleigenschaften von Phycobilinen und Biliproteiden. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 92, 413 (1979)

- [55] H. Scheer. Biliproteine. *Angew. Chem.* 93, 230 (1981)
- [56] G. D. Offner, A. S. Brown-Mason, M. M. Ehrhardt, R. F. Troxler. Primary structure of phycocyanin from the unicellular rhodophyte Cyanidium caldarium. I. Complete amino acid sequence of the α subunit. *J. Biol. Chem.* 256, 12167 (1981)
- [57] R. F. Troxler, M. M. Ehrhardt, A. S. Brown-Mason, G. D. Offner. Primary structure of phycocyanin from the unicellular rhodophyte Cyanidium caldarium. II. Complete amino acid sequence of the β subunit. *J. Biol. Chem.* 256, 12176 (1981)
- [58] G. D. Offner, R. F. Troxler. Primary structure of allophycocyanin from the unicellular rhodophyte, Cyanidium caldarium. The complete amino acid sequences of the α and β subunits. *J. Biol. Chem.* 258, 9931 (1983)
- [59] A. S. Brown, R. F. Troxler. Properties and N-terminal sequence of allophycocyanin from the unicellular rhodophyte Cyanidium caldarium. *Biochem. J.* 163, 571 (1977)
- [60] A. S. Brown, J. A. Foster, P. V. Voynow, C. Franzblau, R. F. Troxler. Allophycocyanin from the filamentous cyanophyte, Phormidium luridum. *Biochemistry* 14, 3581 (1975)
- [61] T. Schirmer, W. Bode, R. Huber, W. Sidler, H. Zuber. X-ray crystallographic structure of the light-harvesting biliprotein C-phycocyanin from the thermophilic cyanobacterium Mastigocladus laminosus and its resemblance to globin structures. *J. Mol. Biol.* 184, 257 (1985)
- [62] T. Schirmer, R. Huber, M. Schneider, W. Bode, M. Miller, M. L. Hackert. Crystal structure analysis and refinement at 2.5 Å of hexameric C-phycocyanin from the cyanobacterium Agmenellum quadruplicatum. *J. Mol. Biol.* 188, 651 (1986)
- [63] E. Gantt, M. R. Edwards, L. Provasoli. Chloroplast structure of the cryptophyceae. Evidence for phycobiliproteins within intrathylakoidal spaces. *J. Cell Biol.* 48, 280 (1971)
- [64] W. Wehrmeyer. Zur Feinstruktur der Chloroplasten einiger photoautotropher Cryptophyceen. *Arch. Microbiol.* 71, 367 (1970)
- [65] A. N. Glazer. Phycobilisome. A macromolecular complex optimized for light energy transfer. *Biochim. Biophys. Acta* 768, 29 (1984)
- [66] H. Zuber. Structure and function of light-harvesting complexes and their polypeptides. *Photochem. and Photobiol.* 42, 821 (1985)

- [67] F. J. Leeper. The biosynthesis of porphyrins, chlorophylls, and vitamin B₁₂. Natural Product Report 2, 19 (1985)
- [68] F. J. Leeper. The biosynthesis of porphyrins, chlorophylls, and vitamin B₁₂. Natural Product Report 2, 561 (1985)
- [69] R. F. Troxler, L. Bogorad. Studies on the formation of phycocyanin, porphyrins, and a blue phycobilin by wild-type and mutant strains of Cyanidium caldarium. Plant Physiol. 41, 491 (1966)
- [70] R. F. Troxler, R. Lester. Biosynthesis of phycocyanobilin. Biochemistry 6, 3840 (1967)
- [71] R. F. Troxler, P. Kelly, S. B. Brown. Phycocyanobilin synthesis in the unicellular rhodophyte Cyanidium caldarium. Biochem. J. 172, 569 (1978)
- [72] R. F. Troxler, A. S. Brown, R. Lester, P. White. Bile pigment formation in plants. Science 167, 192 (1970)
- [73] R. F. Troxler. Synthesis of bile pigments in plants. Formation of carbon monoxide and phycocyanobilin in wild-type and mutant strains of the alga, Cyanidium caldarium. Biochemistry 11, 4235 (1972)
- [74] R. F. Troxler, A. S. Brown, S. B. Brown. Bile pigment synthesis in plants. Mechanism of ¹⁸O incorporation into phycocyanobilin in the unicellular rhodophyte, Cyanidium caldarium. J. Biol. Chem. 254, 3411 (1979)
- [75] S. B. Brown, A. J. Holroyd, R. F. Troxler. Mechanism of bile-pigment synthesis in algae. ¹⁸O-Incorporation into phycocyanobilin in the unicellular rhodophyte, Cyanidium caldarium. Biochem. J. 190, 445 (1980)
- [76] S. B. Brown, J. A. Holroyd, R. F. Troxler, G. D. Offner. Bile pigment synthesis in plants. Incorporation of haem into phycocyanobilin and phycobiliproteins in Cyanidium caldarium. Biochem. J. 194, 137 (1981)
- [77] S. B. Brown, J. A. Holroyd, D. I. Vernon, R. F. Troxler, K. M. Smith. The effect of N-methylprotoporphyrin IX on the synthesis of photosynthetic pigments in Cyanidium caldarium. Further evidence for the role of haem in the biosynthesis of plant bilins. Biochem. J. 208, 487 (1982)
- [78] S. I. Beale, N. C. Chen. N-Methyl mesoporphyrin IX inhibits phycocyanin, but not chlorophyll synthesis in Cyanidium calda-

- rium. Plant Physiol. 71, 263 (1983)
- [79] J. E. Jurgenson, S. I. Beale, R. F. Troxler. Biosynthesis of α -aminolevulinic acid in the unicellular rhodophyte, Cyanidium caldarium. Biochem. Biophys. Res. Commun. 69, 149 (1976)
- [80] R. F. Troxler, G. D. Offner. δ -Aminolevulinic acid synthesis in a Cyanidium caldarium mutant unable to make chlorophyll a and phycobiliproteins. Arch. Biochem. Biophys. 195, 53 (1979)
- [81] H. S. Belford, G. D. Offner, R. F. Troxler. Phycobiliprotein synthesis in the unicellular rhodophyte, Cyanidium caldarium. Cell-free translation of the mRNAs for the α and β subunit polypeptides of phycocyanin. J. Biol. Chem. 258, 4503 (1983)
- [82] K. Steinmüller, K. Zetsche. Photo- and metabolite regulation of the synthesis of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase and the phycobiliproteins in the alga Cyanidium caldarium. Plant Physiol. 76, 935 (1984)
- [83] D. Shemin. Synthesis of labeled substrates. in "Methods in Enzymology", Vol. 4, S. P. Colowick und N. O. Kaplan, Eds., Academic Press, New York (1957)
- [84] A. R. Battersby, E. Hunt, E. McDonald, J. Moron. Biosynthesis of porphyrins and related macrocycles. Part II. Synthesis of δ -amino[5- ^{13}C]laevulinic acid and [11- ^{13}C]prophobilinogen: Incorporation of the latter into protoporphyrin-IX. J. C. S. Perkin I, 2917 (1973)
- [85] D. A. Evans, P. J. Sidebottom. A simple route to α -aminoketones and related derivatives by dianion acylation reactions; an improved preparation of δ -aminolevulinic acid. J. C. S. Chem. Comm., 753 (1978)
- [86] S. F. McDonald. Methyl 5-bromolevulinate. Can. J. Chem. 52, 3257 (1974)
- [87] A. Pfaltz, S. Anwar. Synthesis of α -aminoketones via selective reduction of acyl cyanides. Tetrahedron Lett. 25, 2977 (1984)
- [88] C. Herdeis, A. Dimmerling. Eine dreistufige Synthese der δ -Aminolaevulinsäure. Arch. Pharm. 317, 304 (1984)
- [89] A. Gossauer, R.-P. Hinze, R. Kutschen. Synthesen von Gallenfarbstoffen, XI. Totalsynthese und Zuordnung der relativen Konfiguration zweier epimerer Methanol-Addukte des Phycocyanobilin-dimethylesters. Chem. Ber. 114, 132 (1981)

- [90] A. F. McDonagh, L. A. Palma. Preparation and properties of crystalline biliverdin IX α . Simple methods for preparing isomerically homogenous biliverdin and [^{14}C]biliverdin by using 2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone. *Biochem. J.* 189, 193 (1980)
- [91] R. Bonnett, A. F. McDonagh. The meso-reactivity of porphyrins and related compounds. Part. VI. Oxidative cleavage of the haem system. The four isomeric biliverdins of the IX series. *J. C. S. Perkin I*, 881 (1973)
- [92] H. Lehner, S. E. Braslavsky, K. Schaffner. Phytochrome models, I. Isolation, characterization, and solution conformation of biliverdin dimethyl ester and its XIII α isomer. *Liebigs Ann. Chem.* 1978, 1990
- [93] H. Falk, K. Grubmayr, E. Haslinger, T. Schleder, K. Thirring. Beiträge zur Chemie der Pyrrolpigmente, 25. Mitt.: Die diastereomeren (geometrisch isomeren) Biliverdindimethylester - Struktur, Konfiguration und Konformation. *Monatsh. Chem.* 109, 1451 (1978)
- [94] C. Petrier, C. Dupuy, P. Jardon, R. Gautron. Aspects de la réactivité des biliverdines IX β et γ dimethyl esters. Étude structurale de nouvelles biliverdines. *Nouveau J. de Chimie* 6, 495 (1982)
- [95] M. Bois-Choussy, M. Barbier. Photochemistry of biliverdin IX δ as model for the study of the photoproducts from natural biliverdin IX γ (pterobilin). *Helv. Chim. Acta* 63, 1098 (1980)
- [96] B. P. Kremer, G. B. Feige, H. A. W. Schneider. A new proposal for the systematic position of *Cyanidium caldarium*. *Naturwissenschaften* 65, 157 (1978)
- [97] W. Rüdiger. Chromsäure- und Chromatabbau von Gallenfarbstoffen. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 350, 1291 (1969)
- [98] J. C. Docherty, G. D. Firneisz, B. A. Schacter. Methene bridge carbon atom elimination in oxidative heme degradation catalyzed by heme oxygenase and NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Arch. Biochem. Biophys.* 235, 657 (1984)
- [99] J. C. Docherty, B. A. Schacter, G. D. Firneisz, S. B. Brown. Mechanism of action of heme oxygenase. A study of heme degradation to bile pigment by ^{18}O labeling. *J. Biol. Chem.* 259, 13066 (1984)

- [100] S. B. Brown, J. A. Holroyd. Biosynthesis of the chromophore of phycobiliproteins. A study of mesohaem and mesobiliverdin as possible intermediates and further evidence for an algal haem oxygenase. *Biochem. J.* 217, 265 (1984)
- [101] S. I. Beale, J. Cornejo. Enzymatic heme oxygenase activity in soluble extracts of the unicellular red alga, Cyanidium caldarium. *Arch. Biochem. Biophys.* 235, 371 (1984)
- [102] S. I. Beale, J. Cornejo. Biosynthesis of phycocyanobilin from exogenous labeled biliverdin in Cyanidium caldarium. *Arch. Biochem. Biophys.* 227, 279 (1983)
- [103] S. B. Brown, J. A. Holroyd, D. I. Vernon. Biosynthesis of phycobiliproteins. Incorporation of biliverdin into phycocyanin of the red alga Cyanidium caldarium. *Biochem. J.* 219, 905 (1984)
- [104] S. I. Beale, J. Cornejo. Enzymic transformation of biliverdin to phycocyanobilin by extracts of the unicellular red alga Cyanidium caldarium. *Plant Physiol.* 76, 7 (1984)
- [105] J.-P. Weller, A. Gossauer. Synthesen von Gallenfarbstoffen, X. Synthese und Photoisomerisierung des racem. Phytochromobilin-dimethylesters. *Chem. Ber.* 113, 1603 (1980)
- [106] C. H. Gray, A. Kulczycka, D. C. Nicholson. The chemistry of the bile pigments. Part IV. Spectrophotometric titration of the bile pigments. *J. C. S. II*, 2276 (1961)
- [107] M. Bois-Choussy, M. Barbier. Isomerizations and cyclizations in bile pigments. *Heterocycles* 9, 677 (1978)
- [108] H. Falk, N. Müller, S. Wansch. Zur Chemie der Pyrrolpigmente, 63. Mitt.: Phytochrommodelstudien: Das System 2,3-Dihydrobilatrien - Hexamethylphosphorsäuretriamid als Modell für gestreckte Chromophore. *Monatsh. Chemie* 116, 1087 (1985)
- [109] R. B. Frydman, M. L. Tomaro, G. Buldain, J. Awruch, L. Diaz, B. Frydman. Specificity of heme oxygenase: A study with synthetic hems. *Biochemistry* 20, 5177 (1981)
- [110] P. O'Carra, E. Collieran. Haem catabolism and coupled oxidation of haemproteins. *FEBS Lett.* 5, 295 (1969)
- [111] S. G. Blumenthal, D. B. Taggart, R. M. Ikeda, B. H. Ruebner, D. E. Bergstrom. Conjugated and unconjugated bilirubins in bile of humans and rhesus monkeys. *Biochem. J.* 167, 535 (1977)
- [112] M. Choussy, M. Barbier, M. Vuillaume. Biosynthèse de la phorca-

- biline, pigment biliaire bleu d'Actias selene (Lepidoptera, Attacidae). Biochimie 57, 369 (1975)
- [113] M. Bois-Choussy, M. Barbier. Biosynthesis of the bile pigment sarpedobilin from [^{14}C]pterobilin by Papilio sarpedon (Lepidoptera). Biochem. Biophys. Res. Commun. 110, 779 (1983)
- [114] D. J. Chapman, D. L. Fox. Bile pigment metabolism in the sea-hare Aplysia. J. exp. mar. Biol. Ecol. 4, 71 (1969)
- [115] A. Gossauer, M. Blacha-Puller. Synthesen von Gallenfarbstoffen, XIII. Darstellung von 3,4-Dihydro-5(1H)-pyrromethenonen aus 5(1H)-Pyrromethenonen sowie 5(2H)-Dipyrromethanonen. Liebigs Ann. Chem. 1981, 1492
- [116] H. Plieninger, I. Preuss. Ein neuer synthetischer Weg zu Phytochromobilin-ähnlichen Gallenfarbstoffen. Liebigs Ann. Chem. 1983, 585
- [117] A. Gossauer, J.-P. Weller. Synthesen von Gallenfarbstoffen, VI. Totalsynthese des (+)(4R,16R)- und (-)(4R,16S)-[18-Vinyl]meso-urobilin IX α -dimethylesters. Chem. Ber. 111, 486 (1978)
- [118] E. Bullock, A. W. Johnson, E. Markham, K. B. Shaw. A synthesis of coproporphyrin III. J. C. S., 1430 (1958)
- [119] A. W. Johnson, E. Markham, R. Price, K. B. Shaw. The synthesis of tri- and tetra-alkylpyrroles. J. C. S., 4254 (1958)
- [120] K. M. Smith, G. W. Craig, F. Eivazi, Z. Martynenko. Convenient synthesis of t-butyl pyrrole-2-carboxylates from 2-methylpyrroles. Synthesis, 493, (1980)
- [121] A. H. Jackson, G. W. Kenner, K. M. Smith. Pyrroles and related compounds. Part XVII. Porphyrin synthesis through b-bilenes. J. C. S., (C), 502 (1971)
- [122] A. R. Battersby, D. A. Evans, K. H. Gibson, E. McDonald, L. Nixon. Biosynthesis of porphyrins and related macrocycles. Part I. Synthesis of ^{14}C -labelled pyrromethanes. J.C.S. Perkin I, 1546 (1973)
- [123] A. Gossauer, D. Miehe. Synthesen von Gallenfarbstoffen, III. Totalsynthese des Mesobilirhodin-dimethylesters. Liebigs Ann. Chem. 1974, 352
- [124] A. Hassner, V. Alexanian. Direct room temperature esterification of carboxylic acids. Tetrahedron Lett. 46, 4475 (1978)
- [125] H. Falk, U. Zrunek. Beiträge zur Chemie der Pyrrolpigmente, 50.

- Mitt.: Phytochrommodellstudien: Das Laktam - Laktingleichgewicht des Pyrrolidinonfragmentes von 2,3-Dihydrobilatrienen-abc - Protonierungsgleichgewichte. Monatsh. Chem. 114, 983 (1983)
- [126] M. B. Allen. Studies with Cyanidium caldarium, an anomalously pigmented chlorophyte. Arch. Mikrobiol. 32, 270 (1959)

Lebenslauf

- 17.10.1957 Geburt in Augsburg
- 1964-1970 Volksschule a. d. Spicherer Straße, Augsburg
- 1970-1974 Mädchenrealschule Maria-Stern, Augsburg-Göggingen
- 1974-1977 Holbein-Gymnasium Augsburg
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Zweig)
- 1977 Beginn des Studiums der Biologie und Chemie für das
Lehramt an den Gymnasien
- 1979 Diplom-Biologen-Vorprüfung
- 1982 Diplom-Biologen-Hauptprüfung
Diplomarbeit: am Lehrstuhl für Phytochemie unter der
Leitung von Herrn Dr. habil. H.-P. Köst
Beginn der Dissertation
- 1983 Erste wissenschaftliche Prüfung für das Lehramt an den
Gymnasien
- 1984 Fortsetzung der Dissertation im Institut für organische
Chemie der Universität Fribourg, Schweiz

